

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. R. Schulz

Untersuchungen zur Aussagekraft
von ^3H -Uridinaufnahme und -metabolismus
als Vitalitätskriterium isolierter Hepatozyten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität

München

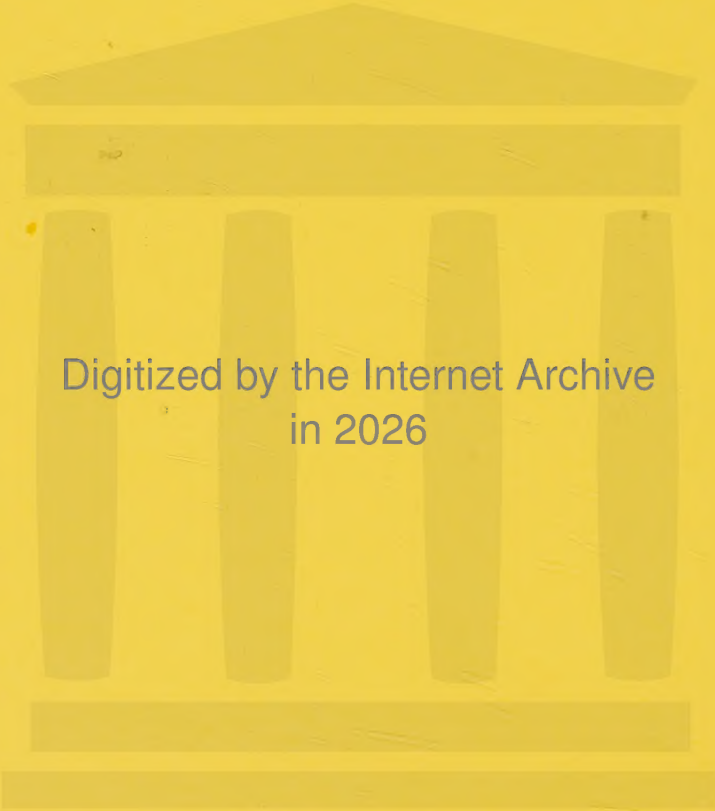
vorgelegt von

Angelika de Bruyne

aus

Karlsruhe

1987



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554808_0060

Aus dem Institut für Pharmakologie, Toxikologie und Pharmazie
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. R. Schulz

Untersuchungen zur Aussagekraft
von ^3H -Uridinaufnahme und -metabolismus
als Vitalitätskriterium isolierter Hepatozyten

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde

der Tierärztlichen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität

München

vorgelegt von

Angelika de Bruyne

aus

Karlsruhe

1987

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. H. Zucker
Referent:	Prof. Dr. A. Petter
Korreferent:	Prof. Dr. D. Giesecke

Tag der Promotion:	24. Juli 1987
--------------------	---------------

Danksagung

Mein Dank gilt den Herren Priv. Doz. Dr. F.R. Ungemach und Prof. Dr. A. Petter für die Überlassung des Themas und die Betreuung der Arbeit.

Herrn Dr. Ch. Altschuh danke ich für seine Hilfe bei der Durchführung der HPLC.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

Seite

V. Verwendete Abkürzungen

EINLEITUNG

1.	Sinn der Vitalitätskriterien	1
2.	Anforderungen an Vitalitätskriterien	1
3.	Einteilung der Vitalitätskriterien	2
4.	Vitalitätskriterien und Zellschädigung	3
4.1.	Grundsätzliche Überlegungen zur Aussagekraft von Vitalitätskriterien	3
4.2.	Untersuchungen über die Aussagekraft einzelner Vitalitätskriterien	5
4.2.1.	Die Trypanblaufärbbarkeit als Vitalitätskriterium isolierter Hepatozyten	8
4.2.2.	Der intrazelluläre Kaliumgehalt als Vitalitätskriterium isolierter Hepatozyten	9
4.2.3.	Der intrazelluläre Glutathiongehalt als Vitalitätskriterium isolierter Hepatozyten	11
4.2.4.	Die Malondialdehydbildung als Vitalitätskriterium isolierter Hepatozyten	13
4.2.5.	Der Laktat-Pyruvat-Quotient als Vitalitätskriterium isolierter Hepatozyten	14
4.2.6.	Der Laktat-Dehydrogenese-Freisetzung als Vitalitätskriterium isolierter Hepatozyten	16
4.2.7.	Der Thymidintransport als Vitalitätskriterium isolierter Hepatozyten	17

	Seite
4.3. Gesamtbeurteilung der untersuchten Vitalitätskriterien	18
5. Die Uridinaufnahme als mögliches Vitalitätskriterium isolierter Hepatozyten	21
5.1. Derzeitige Kenntnisse über die Aufnahme von Uridin in isolierte Hepatozyten	21
5.2. Derzeitige Kenntnisse über den Uridinmetabolismus	22
6. Problemstellung	25

METHODIK

7. Isolierung von Leberparenchymzellen	26
7.1. Tiermaterial	26
7.2. Hepatozytenisolierung	26
8. Analytische Methoden	28
8.1. Trypanblaufärbung	28
8.2. Bestimmung des Proteingehalts	29
8.3. Messung von Laktat und Pyruvat	29
8.4. Ermittlung des intrazellulären Kaliumgehalts	29
8.5. Messung der Uridinaufnahme in isolierte Hepatozyten	30
8.5.1. Konzentrationsabhängiger Uridintransport	30
8.5.2. Zeitabhängiger Uridintransport	32
8.6. Auswärtstransport von Uridin und -metaboliten	33
8.7. Chromatographische Auftrennung von Uridin und -metaboliten	33

	Seite
9. Schädigung der Leberzellen	36
9.1. Anoxie	36
9.2. Mechanische Schädigung	36
10. Statische Analyse	36
11. Verwendete Substanzen und Reagentien	37

ERGEBNISSE

12. Kalium-Gehalt, Laktat-Pyruvat-Quotient und Trypanblauanfärbbarkeit ungeschädigter Hepatozyten	38
13. Vitalitätskriterien bei mechanischer Schädigung von Hepatozyten	39
14. Vitalitätskriterien isolierter Hepatozyten bei O ₂ -Mangel	43
15. Der Uridintransport bei nicht geschädigten Hepatozyten	47
15.1. Zeitabhängigkeit des Uridintransport	47
15.2. Konzentrationsabhängigkeit des Uridintransport	49
15.3. Auswärtstransport von Uridin und -metaboliten	54
16. Uridinmetabolismus	55
16.1. Die Inkorporation von ³ H-Uridin in zelluläre Nukleinsäuren	55
16.2. Uridinmetabolismus bei nicht geschädigten Hepatozyten	58

	Seite
17. Uridinaufnahme und -metabolismus bei geschädigten Hepatozyten	63
17.1. Der Uridintransport bei Hepatozytenschädigung durch N ₂ -Begasung	63
17.2. Der Uridintransport bei mechanischer Schädigung der Hepatozyten	68
17.3. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse	72
18. DISKUSSION	77
19. Zusammenfassung	85
20. Summary	87
21. Literaturverzeichnis	89
22. Lebenslauf	100

Verwendete Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CCl ₄	Tetrachlorkohlenstoff
dCMP	Desoxycytidinmononophosphat
dCDP	Desoxycytidindiphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpm	Zerfälle pro Minute
ER	Endoplasmatisches Reticulum
GSH	Glutathion reduziert
GS°	Glutathionylradikal
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
K _M	Michaelis-Menten-Konstante von Enzymreaktionen
K _t	Michaelis-Menten-Konstante von Transportprozessen
MDA	Malondialdehyd
MEM	Minimum Essential Medium
NAD ⁺	B-Nicotinamid-adenin-dinukleotid
NADH	B-Nicotinamid-adenin-dinukleotid reduziert
ΣP	Summe der Nukleotide
RNA	Ribonukleinsäure
U	Uridin
UMP	Uridinmonophosphat
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
V	Maximale Umsatzgeschwindigkeit bei Transportprozessen



EINLEITUNG

1. Sinn der Vitalitätskriterien

Mit der Entwicklung praktikabler Methoden zur Gewinnung von vitalen Hepatozyten (8) haben isolierte Leberparenchymzellen große Bedeutung in der experimentellen Pharmakologie und Toxikologie gewonnen (34, 40, 61, 68). In jüngster Zeit ist es gelungen, menschliche Hepatozyten aus Leberbiopsien zu kultivieren (5), was auch im Bereich der klinischen Erforschung von Lebererkrankungen neue Perspektiven eröffnet.

Die Vorteile bei der Verwendung von isolierten Hepatozyten gegenüber in vivo-Untersuchungsmethoden bestehen u.a. in der Ausschaltung von Faktoren, die Vorgänge auf hepatozellulärer Ebene überdecken können. Hier sind insbesondere hämodynamische, hormonelle, neuronale und immunologische Einflüsse zu bedenken.

Um Aussagen über die Wirkung von bestimmten Versuchsbedingungen auf isolierte Hepatozyten treffen zu können, muß der Zustand der Zellen, ihre Vitalität, erfaßt werden können. Diesem Zweck dienen diverse biochemische und morphologische Vitalitätskriterien. Die Vitalitätskriterien sollen es ermöglichen, intakte Zellen gegen geschädigte abzugrenzen, sowie Ausmaß und Art einer Schädigung zu definieren.

2. Anforderungen an Vitalitätskriterien

Ein ideales Vitalitätskriterium sollte

- schnell und leicht bestimmbar sein und dabei
- sensibel und reproduzierbar auf Änderungen der Vitalität reagieren,

- sowohl auf metabolische Störungen als auch auf Membranschäden ansprechen, ohne selbst schädigende Einflüsse auf den Hepatozyten auszuüben,
- von sonstigen Einflüssen unabhängig nur auf tatsächliche Änderungen der Zellvitalität ansprechen

(nach 66).

Inwieweit häufig verwendete Kriterien diesen Anforderungen genügen, soll im Folgenden untersucht werden.

3. Einteilung der Vitalitätskriterien

Die Einteilung einiger Vitalitätskriterien ist in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Einige Vitalitätskriterien isolierter Hepatozyten

morphologische Kriterien		biochemische Kriterien	
Mikroskopie		Membranparameter	metabolische Parameter
- Zellgröße (Schwellung) - Aussehen (Zelloberfläche, Plasmamembran) - Zellinhalt (Vakuolen, Kernpyknose Karyorhexis) - Anfärbbarkeit (z.B. mit Trypanblau)	Ultrastruktur der Zelle (Elektronenmikroskopie)	- Enzymaustritt - ^{51}Cr-Austritt - Membranpotential - intrazelluläres K^+ - Atmungsstimulation durch Succinat - transmembranale Transportprozesse (Nukleoside, Aminosäuren)	- Synthesevorgänge (Harnstoff, Glukoneogenese, Proteinsynthese) - intrazelluläres Glutathion - O_2-Verbrauch - Laktat/Pyruvat - pH-Wert - ATP/ADP - NADH/NAD$^+$ - Malondialdehydbildung - Fremdstoffmetabolismus (z.B. Fluoresceindiacetat)

4. Vitalitätskriterien und Zellschädigung

4.1. Grundsätzliche Überlegungen zur Aussagekraft von Vitalitätskriterien

Bei der Entstehung einer irreversiblen Zellschädigung ist der Integrität der Plasmamembran eine zentrale Bedeutung beizumessen (22, 63, 71). Deshalb ist bei der Beurteilung von Vitalitätskriterien die Frage, wie sensitiv der Zustand zellulärer Membranen wiedergegeben wird, von besonderem Interesse.

Am Beispiel der Zellschädigung durch CCl_4 wird dies besonders deutlich: Weitreichende Störungen des endoplasmatischen Retikulums und von Stoffwechselfunktionen (52) mit geringfügiger Beeinträchtigung der Plasmamembran bleiben über lange Zeit reversibel. Erst mit dem Auftreten von morphologischen und funktionellen Änderungen der Plasmamembran, durch die die lebenswichtige Funktion der Plasmamembran als Permeationsbarriere verloren geht, entsteht ein irreversibler Zellschaden (23). Morphologisch zeigt sich die irreversible Zellschädigung in einer osmotischen Schwellung der Hepatozyten (Tab. 2).

Der Ablauf in Tab. 2 gilt prinzipiell für viele Hepatotoxine: Alle Veränderungen an Stoffwechsel und an zellulären Membranen bleiben reversibel, solange die Zellkompartimente (z.B. Lysosomen und Mitochondrien) gegeneinander sowie insbesondere die gesamte Zelle gegen das umgebende Medium ausreichend abgegrenzt bleiben. Die Grenze zur Irreversibilität wird erst überschritten, wenn diese Kompartimentierung entfällt.

Tabelle 2: Ablauf der Leberzellschädigung durch CCl₄

Stunden post appl.	Biochemisch		Morphologisch
	Abnahme	Zunahme	
0,25 ↓ 0,5	Lipidperoxidation kovalente Bindung	Lipidperoxidation kovalente Bindung	ER-Dilatation glatte Tubuli
↓ 1 ↓ 4 ↓ 6 ↓ 8	Cytochrom P-450 Aminopyrimidinemethylase Glukose-6-Phosphatase Proteinsynthese Lipoproteinsekretion mikros. Calciumpumpe Phospholipidsynthese Isocitratdehydrogenase Ornithindecaboxylase Esterasen NADPH Phospholipide ungesätt. Fettsäuren Kalium Transmembranpotential	UDP-Glukuronyl- Transferase (Flavoproteine) Triglyceride intrazell. Calcium -Aminolävulinat-Synthetase Natrium	Plasmamembran unscharf
↓ 12 ↓ 18 ↓ 24	Na ⁺ , K ⁺ -ATPase Verlust intrazell. Enzyme irreversibel	intrazell. Calcium freie lysosomale Enzyme	Tubuliaggregate Fettröpfchen Polysomenverlust ER-Kollaps Ballonzellen Plasmamembranbeulen ER-Disintegration Mitochondrien- schwellung Zellnekrose

ER = endoplasmatisches Retikulum

(nach 66)

Daraus läßt sich folgern, daß insbesondere solche Vitalitätskriterien, die Aussagen zur Plasmamembranfunktion und -integrität zulassen, für die Beurteilung des Schweregrades einer Zellschädigung, v.a. im Hinblick auf die Reversibilität, von Bedeutung sind, während solche Schlußfolgerungen anhand von Veränderungen metabolischer Parameter nicht möglich sind.

Mittels der Membrankriterien läßt sich jedoch keine Aussage darüber machen, wo der primäre Angriffspunkt einer Noxe liegt, da eine Schädigung der Zellmembran entweder sekundär als Folge einer metabolischen Störung entstanden sein kann (wie z.B. im Falle von Galaktosamin, Uridin, Ethionin) oder die Folge einer direkten, primären Schädigung der Membran ist (z.B. organische Lösungsmittel) (76).

4.2. Untersuchungen über die Aussagekraft einzelner Vitalitätskriterien

Tab. 3 gibt einen Überblick über die Wirkungsweise einiger Vitalitätskriterien isolierter Hepatozyten, die häufig verwendet werden.

Zur Beurteilung der Aussagekraft ist es notwendig, den "Angriffspunkt" der Vitalitätskriterien zu kennen. Jedes Kriterium hat ein eigenes Anwendungsspektrum. In diesem Sinne stellte sich beispielsweise bei der Untersuchung der hepatotoxischen Wirkung verschiedener Xenobiotica heraus, daß keines von sechs Vitalitätskriterien auf alle sechs verwendeten Substanzen ansprach (71).

Tabelle 3: Wirkungsweise einiger häufig verwendeter Vitalitätskriterien

Kriterium	Wirkungsweise	Normalwert frisch präparierter Hepatozyten
Zelldurchmesser		20 [μm] (33)
Zellumrisse		rundlich (33)
Trypanblaufärbbarkeit	Die intakte Zellmembran ist nicht permeabel für Trypanblau. Bei Membranschädigung tritt Trypanblau ins Zellinnere ein (2, 8).	6,5 $\pm$ 1,10 (% anfärbbare Zellen)
Membranpotential	Durch unterschiedliche Ionenverteilung zwischen Innen- und Außenseite der Membran (innen K ⁺ , außen Na ⁺) kommt ein Potential zustande. Bei Membranschädigung verändert sich die Ionenverteilung und damit das Potential.	36,3 $\pm$ 3,3 [mV] (6)
Malondialdehyd (MDA)	Typisches Abbauprodukt nach Lipidperoxidation mehrfach ungesättigter Fettsäuren am zellulären Membransystem.	0,1 [nmol/mg] Zellen (66)
Atmungsstimulation durch Succinat	Intakte Zellmembranen sind impermeabel für Succinat. Nur bei Membranschäden gelangt Succinat in die Zelle und bewirkt eine flavin-abhängige Steigerung des O ₂ -Verbrauchs (6).	Steigerung des O ₂ -Verbrauchs 15 %
Thymidintransport	In Hepatozyten membranständiges aktives Transportsystem mit Lipidabhängigkeit von Hepatozyten (68, 69).	Thymidinkonzentration 2 $\mu\text{mol/l}$: Transportrate: 0,2 [pmol/(10 ⁶ Zellen x s)]; intrazell. Anreicherung: 4-fach

Tabelle 3: Wirkungsweise einiger häufig verwendeter Vitalitätskriterien

Kriterium	Wirkungsweise	Normalwert frisch präparierter Hepatozyten
intrazelluläres K^+	Bei Permeabilitätsstörungen und/oder Hemmung der Na^+K^+ -ATPase strömt K^+ aus der Zelle. Der K^+ Gehalt fällt ab.	$133,8 \pm 6,41$ [mmol/l] (66)
Laktat-Dehydrogenaseverlust	Bei Membranschädigung verliert die Zelle Enzyme nach außen.	Verlust von 10 % der intrazell. Gesamtkaktivität (45)
intrazelluläres Glutathiongehalt	Reduziertes Glutathion (GSH) fängt freie Radikale und entzieht sie ihren Folgereaktionen (z.B. Kovalente Bindung, Lipidperoxidation).	~ 50 μ mol/10 ⁶ Zellen] (1)
O_2 -Verbrauch + 2μ mol/l CCP	O_2 -Verbrauch entspricht metabolischem Funktionszustand. Deutliche Respirationssteigerung durch Entkoppler wie Carbonyl-Cyanid-phenylhydrazon (CCP) weist auf eine ausreichende Kopplung der Atmung an die oxidative Phosphorylierung hin (66). Quotient gibt zytoplasmatischen Redoxstatus von $NADH + H^+/NAD^+$ wieder. Quotient steigt unter anaeroben Bedingungen.	$3,02 \pm 0,134$ μ mol/ O_2 (min x g Zellen)] (66) + CCP: Anstieg 50 %
Laktat Pyruvat		$8,42 \pm 0,465$ (66)
ATP/ADP	Das Verhältnis ATP/ADP spiegelt die allgemeine Stoffwechselaktivität der Zelle wieder (z.B. Substratkettenphosphorylierung, oxidative Phosphorylierung). Bei metabolischen Störungen wie Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung oder Verringerung der Glykolyse wird weniger ATP gebildet, der Quotient nimmt ab.	$37 : 1$ [nmol/mg Protein] ATP : ADP (6)
Glukoseproduktion	Kontrollparameter für komplexe biochemische Vorgänge in Mitochondrien und Cytosol (14).	$20,1 \pm 1,81$ μ mol/(hxg Zellen)] (66)

4.2.1. Die Trypanblauanfärbbarkeit als Vitalitätskriterium isolierter Hepatozyten

Der Trypanblautest ist leicht durchführbar. Das Ergebnis liegt sehr schnell vor (29). Daher hat er als Routineverfahren zur raschen Überprüfung der Vitalität isolierter Hepatozyten weite Verbreitung erlangt (Wirkungsmechanismus Tab. 3).

Die Beurteilung der Sensitivität ist uneinheitlich. Baur (6) bemängelt die geringe Empfindlichkeit gegenüber geringfügigen Membranschäden. Andererseits konnte bei mechanischer Zellschädigung eine hohe, statistisch signifikante Korrelation zwischen dem Trypanblautest und dem als sensitiver eingestuften intrazellulären Kaliumgehalt ermittelt werden (66). Müller (47) fand den Trypanblautest bei Schädigung der Membran durch Cadmium sensitiver als den Austritt von Laktatdehydrogenase aus der Zelle. Dies steht im Gegensatz zu anderen Untersuchungen an tiefgekühlten und wieder aufgetauten Hepatozyten, in denen sich der Austritt von LDH als wesentlich empfindlicher erwies als die Anfärbbarkeit der Hepatozyten mit Trypanblau (6).

Unter Berücksichtigung der Wirkungsweise von Farbstoffausschlußtests (29), zu denen auch der Trypanblautest gehört, ergeben sich die Grenzen solcher Tests:

Zellmembranlecks, die kleiner sind als das Farbstoffmolekül, werden nicht erfaßt, da der Farbstoff in diesem Fall nicht in die Zelle eindringen kann. Somit lassen sich weder Änderungen in den physikochemischen Eigenschaften der Plasmamembran erkennen (66) noch metabolische Störungen der Zellen erfassen.

In der Praxis stellt sich das Problem, daß es auch zu einer scheinbaren Verbesserung der Vitalität kommen kann, wenn sich initial geschädigte Zellen auflösen und damit nicht mehr anfärbbar sind (66).

Zu einer differenzierten Beurteilung der Vitalität ist es somit unbedingt erforderlich, noch andere Kriterien mit heranzuziehen.

4.2.2. Der intrazelluläre Kaliumgehalt als Vitalitätskriterium isolierter Hepatozyten

Der intrazelluläre Kaliumgehalt wird von der Na^+ , K^+ -ATPase mittels eines feed-back-Mechanismus gesteuert, d.h. der Kaliumgehalt regelt die Aktivität der Na^+ , K^+ -ATPase (60). Die Na^+ , K^+ -ATPase ist als sogenanntes funktionelles Membranprotein in die Zellmembran eingebettet.

Der intrazelluläre K^+ -Gehalt ist somit ein Parameter für einen integralen Membranbestandteil von Hepatozyten. Daraus resultiert die größere Sensitivität dieses Vitalitätskriteriums gegenüber dem Trypanblautest (6) oder der Freisetzung von intrazellulären Enzymen (47). Im Gegensatz zum Trypanblautest können über den Kaliumgehalt auch Veränderungen der physiko-chemischen Eigenschaften der Membranlipide erfaßt werden (66).

Es gibt jedoch Versuchsbedingungen unter denen der K^+ -Gehalt keine Rückschlüsse auf die Vitalität zuläßt (66, 65). Ungemach (63) konnte zeigen, daß die Vitalität isolierter Hepatozyten, trotz deutlich verringerter K^+ -Werte bei selektiver Hemmung der SH-Gruppen der Na^+ - K^+ -ATPase mit p-Chlormercuriphenylsulfonsäure unverändert blieb.

Ein K^+ -Verlust der Hepatozyten ist aber auch nicht immer Anzeichen für eine Funktionsbeeinträchtigung der Na^+ - K^+ -ATPase. Hegner et al. (31) konnten zeigen, daß der bei Phalloidinvergiftung auftretende K^+ -Verlust bei Hepatozyten nicht auf eine Hemmung des aktiven Kaliumtransportsystems zurückzuführen ist. Vielmehr soll dieser Effekt auf Strukturände-

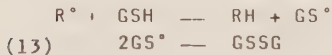
rungen der Membran beruhen. Es entstehen "Leaks" durch die K^+ , dem Konzentrationsgradienten folgend, austritt (29, 40).

Auf O_2 -Mangel bis zu 60 Minuten Dauer reagierten Hepatozyten wider Erwarten nicht mit einem nennenswerten K^+ -Verlust (39). Kroker erklärt dies mit der Fähigkeit von Hepatozyten, den Energiebedarf für längere Zeit über die anaerobe Glykolyse zu decken (55, 39).

Da der K^+ -Gehalt unter verschiedenen Umständen ein falsches Bild von der Vitalität liefert, ist seine Aussagekraft als alleiniges Vitalitätskriterium ebenfalls nicht ausreichend.

4.2.3. Der intrazelluläre Glutathiongehalt als Vitalitätskriterium isolierter Hepatozyten

Reduziertes Glutathion (GSH) übt in der Zelle eine Schutzfunktion gegenüber freien Radikalen aus. Beim Zusammentreffen mit freien Radikalen entsteht aus dem GSH das Thiyl-Radikal $GS^\bullet$. Dieses bildet mit einem zweiten GS-Radikal oxidiertes Glutathion (GSSG):



Als weiterer entgiftender Mechanismus wird die Übertragung von GSH auf toxische Metaboliten diskutiert. Es entstehen untoxische Glutathionyl-Metaboliten (Abb. 2).

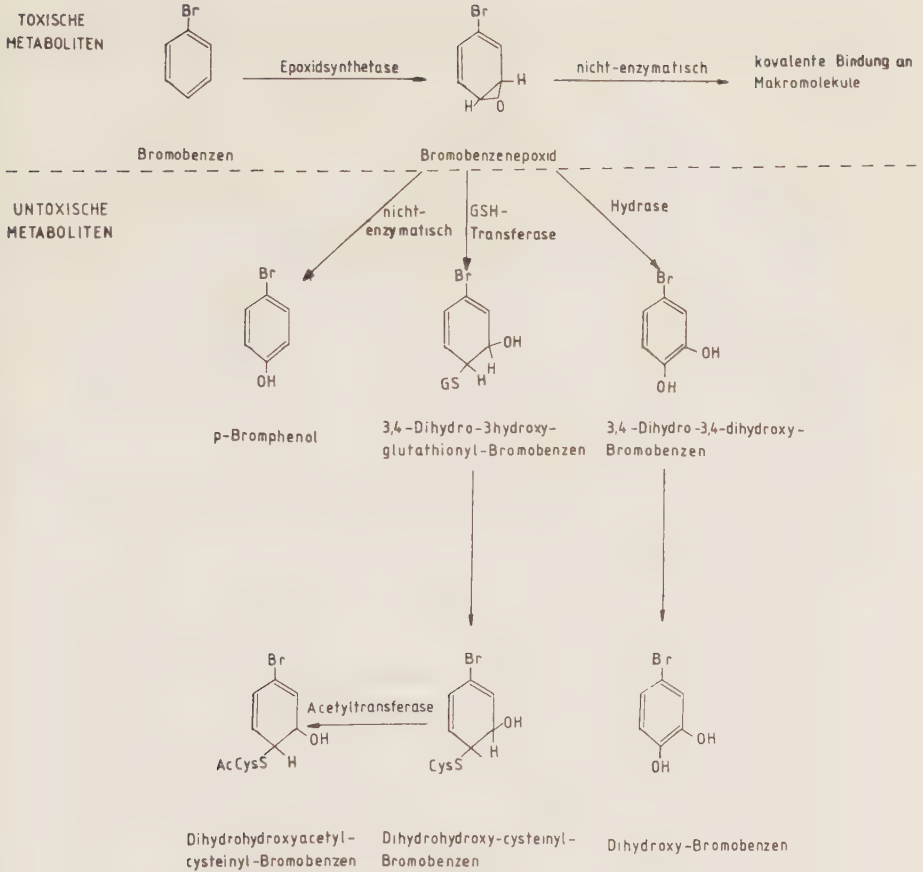


Abbildung 2 Entgiftung von Brombenzol bei Ratten

Alle Stoffwechselwege oberhalb der unterbrochenen Linie führen zu giftigen Produkten. (nach 74)

Die Bedeutung von GSH liegt also in seiner Eigenschaft, reaktive, u.U. toxische Zwischenprodukte "abfangen" zu können.

Es wurde ein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an intrazellulärem GSH und der toxischen Wirkung einiger Substanzen auf Hepatozyten nachgewiesen. Albano et al. (1) konnte zeigen, daß mit Dibrommethan behandelte Hepatozyten eine erniedrigte GSH-Konzentration bei gleichzeitiger Lipidperoxidation und einem Anstieg reaktiver Zwischenprodukte des Dibrommethan aufwiesen.

Die zellschädigende Wirkung von Formaldehyd ließ sich durch Applikation von Diethylmaleat (DEM) steigern. DEM bewirkt einen Abfall des intrazellulären GSH-Spiegels (41).

Aus dem Absinken der intrazellulären GSH-Konzentration kann jedoch nicht zwangsläufig auf eine Schädigung der Zelle geschlossen werden.

Aufgrund des Vorhandenseins mehrerer anderer hepatozellulärer Entgiftungssysteme (mischfunktionelle Oxidasen, Glukuronidierung, Kopplung an Sulfat u.a. (74)) darf eine niedrige GSH-Konzentration nicht mit Zellschädigung gleichgesetzt werden. Einige Substanzen werden von mehreren Systemen gleichzeitig metabolisiert, was beispielsweise für Brombenzol (s. Abb. 2) und für Acetaminophen zutrifft (75). Bei Ausfall oder Überlastung eines Systems kann eine Substanz auch auf anderem Wege entgiftet werden.

Ferner signalisiert eine normale GSH-Konzentration auch nicht, daß keine Zellschädigung vorliegt. Ungemach (66) stellte eine weitgehende Insensitivität des intrazellulären GSH-Spiegels bei peroxidativer Zellschädigung durch die Radikalbildner Bromtrichlormethan und ADP-Fe^{3+} fest. Trypanblau und MDA sowie der Laktat-Pyruvat-Quotient wichen deutlich von den unbehandelten Kontroll-Hepatozyten ab, während GSH noch im Normbereich blieb.

Der GSH-Gehalt von Hepatozyten erscheint somit ungeeignet als Vitalitätskriterium. Es lassen sich weder Art noch Ausmaß einer Schädigung feststellen.

4.2.4. Die Malondialdehydbildung als Vitalitätskriterium isolierter Hepatozyten

Malondialdehyd (MDA) entsteht beim peroxidativen Abbau hochungesättigter Fettsäuren. Es wird als Thiobarbitursäure-Malondialdehyd-Farbstoffkomplex photometrisch gemessen (52).

Die Zuverlässigkeit von MDA bei der Bestimmung einer Lipidperoxidation erscheint jedoch unsicher.

Die MDA-Bildung ist zwar mit anderen Meßparametern zur Erfassung einer Lipidperoxidation korreliert (66), das Ausbleiben der MDA-Bildung ist jedoch nicht beweisend für das Fehlen einer Lipidperoxidation, denn:

- MDA entsteht nur aus Fettsäuren mit mehr als zwei Doppelbindungen (66).
- MDA entsteht nicht stöchiometrisch beim peroxidativen Abbau ungesättigter Fettsäuren, da hierbei als terminale Abbauprodukte auch stabile Hydroxyfettsäuren oder kurz-kettige flüchtige Kohlenwasserstoffe entstehen können (66).
- MDA kann auch von Hepatozyten durch mitochondriale Oxidation abgebaut werden und ist dann nicht mehr bzw. in geringerem Umfang nachweisbar (52).

Die Brauchbarkeit von MDA zur Beurteilung der Vitalität muß aber noch aus einem anderen Grund in Frage gestellt werden. Nach neueren Untersuchungen besteht keine einfache Korrelation zwischen Lipidperoxidation und Vitalitätsverlust von Hepatozyten (17, 57).

Ungemach (66) konnte zeigen, daß der bei Lipidperoxidation auftretende Membranschaden Spätfolge einer Kaskade autokatalytisch ablaufender Prozesse ist. Dabei agiert die initiale Lipidperoxidation nicht als eigentliche Noxe sondern nur als auslösendes Moment einer Serie sich verselbständigender Phospholipase A₂-Aktivierungen. Diese führen schließlich zu irreversiblen Auflösungserscheinungen an der Zellmembran. Das Ausmaß der Membranschädigung steht in keiner einfachen Beziehung zum Umfang der initialen Lipidperoxidation. Somit kann die MDA-Bildung kein Meßparameter für das Ausmaß einer durch Lipidperoxidation bedingten Membranschädigung sein und ist als Vitalitätskriterium deshalb ungeeignet.

4.2.5. Der Laktat-Pyruvat-Quotient als Vitalitätskriterium isolierter Hepatozyten

Laktat und Pyruvat entstehen bei der Glykolyse, wobei NAD⁺ zu NADH+H⁺ reduziert wird (Abb. 3). Bei ausreichender O₂-Versorgung wird NAD⁺ in der Atmungskette regeneriert. Unter hypoxischen Bedingungen wird NAD⁺ vermehrt durch Übertragung des Wasserstoffs von NADH₂ auf Pyruvat rückgebildet. Daraus resultiert eine Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Laktat und Pyruvat zugunsten von Laktat (10). Somit weist ein Laktat/Pyruvat-Quotient von unter 10 auf aerobe Atmung und auf das Vorhandensein ausreichender Mengen an zelleigenen Reduktionsäquivalenten hin (59).

Eine Erhöhung des Laktat-Pyruvat-Quotienten, wie es bei Sauerstoffmangel beschrieben wird, ist jedoch nicht zwangsläufig Anzeichen einer schwerwiegenden Zellschädigung, da unter hypoxischen Bedingungen die funktionelle und strukturelle Integrität isolierter Hepatozyten, zumindest über einen Zeitraum von 180 min., gewahrt bleibt (14, 61).

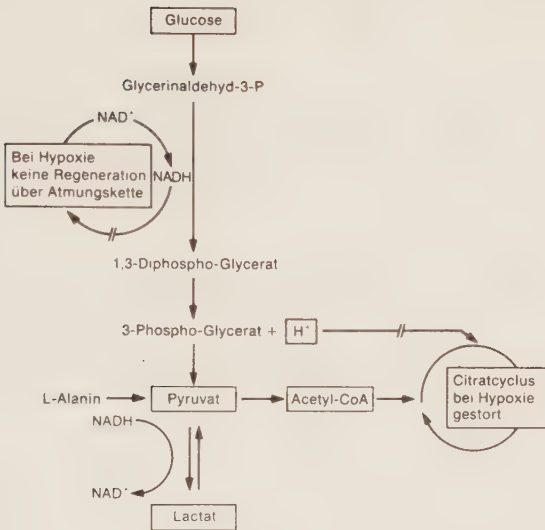


Abbildung 3: Anaerober Glukoseabbau

NAD⁺ wird Überwiegend durch Reduktion von Pyruvat zu Laktat regeneriert (aus Boehringer Testfibel, "Klinik und Labor", Boehringer Mannheim GmbH (1980)).

Die Vermutung, daß der Laktat-Pyruvat-Quotient nicht in unmittelbarer Beziehung zur Vitalität steht, wird weiter erhärtet durch Untersuchungen von Ungemach (66), der zeigen konnte, daß bei peroxidativer Zellschädigung der Laktat-Pyruvat-Quotient zunächst parallel zur MDA-Bildung auf Werte bis zu 80 (normal 10) anstieg, aber bei Einsetzen der für die Vitalität ausschlaggebenden Membranschädigung (23) wieder bis auf den Kontrollwert abgefallen war. Somit reagiert der Laktat-Pyruvat-Quotient nicht sensitiv auf massive Be-

einträchtigung der Vitalität und läßt sich unabhängig von der Vitalität selektiv beeinflussen. Er ist deshalb als Vitalitätskriterium nicht uneingeschränkt aussagekräftig (66).

Für den Laktat-Pyruvat-Quotienten trifft in besonderem Maß zu, was auch für andere metabolische Parameter gilt: Er ist in weiten Grenzen veränderbar, ohne einen Zellschaden zur Folge zu haben oder diesen anzuzeigen.

4.2.6. Die Laktat-Dehydrogenase-Freisetzung

Die LDH-Freisetzung aus Hepatozyten ist ein außerordentlich häufig verwendetes (3, 20, 28, 34, 61, 71), wenn auch auf seine Aussagekraft hin wenig untersuchtes Vitalitätskriterium.

Beim Sensitivitätsvergleich zum Trypanblautest ergaben sich, wie bereits unter 4.2.1. ausgeführt wurde, widersprüchliche Ergebnisse.

Aus den sonstigen o.g. Untersuchungen lassen sich kaum Schlüsse über die Sensitivität der LDH-Freisetzung ziehen, da dort zumeist entweder nur der Trypanblautest oder hinsichtlich einer Membranschädigung nicht aussagekräftige metabolische Kriterien verwendet wurden.

Die LDH-Freisetzung erfaßt ebenso wie die Trypanblauanfärbbarkeit nur das Endstadium einer massiven Störung der Membranpermeabilität, nicht jedoch die Veränderungen in den physiko-chemischen Eigenschaften des Membranlipids, die der Aufhebung der Membranfunktion als Permeationsbarriere vorausgehen (66).

Somit kann die LDH-Freisetzung nur zur Groborientierung über die Vitalität dienen. Aus praktischen Erwägungen heraus (einfache Durchführung, Ergebnis während des Versuches) ist der Trypanblautest zu diesem Zweck besser geeignet. Die

LDH-Freisetzung hat allerdings den Vorteil, daß die Vitalität der Zelle durch die Messung nicht beeinflußt wird, wohingegen Trypanblau als zytotoxisch anzusehen ist (51).

4.2.7. Der Thymidintransport als Vitalitätskriterium isolierter Hepatozyten

Die Thymidinaufnahme isolierter, ruhender Hepatozyten erfolgt über einen aktiven Transportprozess, der über zwei Carriersysteme, einem aktiven Transportsystem und einer erleichterten Diffusion mit unterschiedlicher Affinität zum Thymidin abläuft (69).

Verschiedene Untersuchungen zeigten, daß die Messung der Thymidinaufnahme geeignet ist, auch geringfügige Veränderungen an der Zellmembran zu erfassen. So war die Aufnahmerate von ^3H -Thymidin bei 24 Monate alten Ratten, bei denen eine erhöhte Rigidität des Plasmamembranlipids vorlag (27), gegenüber nur 3 Monate alten Ratten deutlich vermindert (70). Im Vergleich zu intrazellulären Kaliumgehalt oder Trypanblautest erwies sich die Thymidinaufnahme bei geringgradiger Zellschädigung durch sehr kleine Dosen von Diethylnitrosamin bzw. lipophilen Lokalanästhetika als sensitivstes Vitalitätskriterium (70, 71).

Die im Vergleich zum intrazellulären Kaliumgehalt geringe Beeinflußbarkeit des Thymidintransports durch Thiolreagentien (66) oder durch eine 95 %ige Verringerung des intrazellulären ATP-Gehalts (69) stellen im Hinblick auf die Anwendung als Vitalitätskriterium wichtige Vorzüge dar.

Weitere Vorteile des Thymidintransports sind (nach 66):

- bei den verwendeten Konzentrationen ist Thymidin un-
toxisch
- in nicht teilungsaktiven Leberzellen erfolgt kein Meta-
bolismus im Anschluß an die Aufnahme, durch den die Auf-
nahmekinetik beeinflußt würde

- im Gegensatz zu den meisten Membrantransportsystemen besteht keine Abhängigkeit von einem Natriumgradienten.

Aufgrund dieser Eigenschaften und insbesondere wegen der Tatsache, daß es sich bei dem Thymidintransport um einen integralen Membranparameter handelt, der in seiner Aktivität den Veränderungen der physiko-chemischen Eigenschaften des Membranlipids folgt, kann der Thymidintransport als das sensitivste der beschriebenen Vitalitätskriterien zum Nachweis von Schädigungen der Plasmamembran betrachtet werden.

Der Thymidintransport ist in seiner Aktivität jedoch abhängig vom Zellzyklusstand. Als typisches Merkmal nimmt beim Übergang des ruhenden Hepatozyten in den Zellzyklus die Aktivität des hochaffinen Systems ab; in maximal proliferierenden AS 30 D-Hepatomzellen ist dieses Transportsystem nicht mehr nachweisbar (70).

Parallel hierzu kommt es zu einer Steigerung der Phosphorylierungsrate von Thymidin, so daß die Thymidinaufnahme unter proliferativen Bedingungen ein völlig anderes Erscheinungsbild liefert (70).

Da derartige Veränderungen im Verlauf regenerativer Prozesse, z.B. nach toxischer Leberschädigung, aber auch während Carcinogenese auftreten, eignet sich die Messung des Thymidintransports und -metabolismus auch zum Nachweis toxisch oder carcinogen induzierter Zellzyklusänderung (9, 70).

4.3. Gesamtbeurteilung der untersuchten Vitalitätskriterien

Aus Tab. 4 ist ersichtlich, daß die Aussagekraft der meisten Vitalitätsparameter für sich alleine nicht ausreichend ist. Teilweise sind sie nicht sensitiv genug, um die dem Zelltod vorausgehende Membranalteration zu erfassen, z.T. stehen massive Veränderungen nicht immer mit einer Vitalitätsbe-

einträchtigung im Zusammenhang. Neue Perspektiven eröffnet nur der Thymidintransport, da dieser Parameter den Grad der Zellschädigung an der Plasmamembran offensichtlich recht genau aufzeigen kann. Der Thymidintransport erlaubt jedoch in ruhenden Hepatozyten keine Aussagen über den Stoffwechselzustand.

Zelltod ist letztendlich immer Folge eines Membranschadens, der direkt oder durch Störung des Zellmetabolismus bedingt sein kann, wobei aber metabolische Entgleisungen nicht zwangsläufig zum Zelltod führen müssen. Es erscheint deshalb sinnvoll, nach Vitalitätskriterien zu suchen, mit denen sich gleichzeitig Aussagen über folgende Zellschäden machen lassen:

- 1) Metabolische Störungen
- 2) Physiko-chemische Änderungen der Plasmamembran und schließlich
- 3) Desintegration der Plasmamembran

Tabelle 4: Zusammenfassender Überblick über die Aussagekraft einiger Vitalitätskriterien

Vitalitätskriterium	Beurteilung
Trypanblaufärbung	Als nicht integraler Membranparameter nur zur groben Orientierung über die Vitalität (hinsichtlich umfangreicher Permeabilitätsstörungen der Plasmamembran) geeignet.
intrazelluläres Kalium	Als Funktion des integralen Membranenzymystems Na^+ K^+ -ATPase: hohe Sensitivität. Nachteil: selektive Beeinflussbarkeit z.B. durch Thiolreagentien ohne Veränderung der Vitalität.
intrazelluläres Glutathion	Als Vitalitätskriterium ungeeignet, da keine direkte Beziehung zur Vitalität
Malondialdehydbildung	Als Vitalitätskriterium ungeeignet, da vielfach keine direkte Beziehung zur Vitalität
Laktat-Pyruvat-Quotient	Als Vitalitätskriterium ungeeignet, da vielfach keine direkte Beziehung zur Vitalität
Laktatdehydrogenasefreisetzung	Als nicht integraler Membranparameter nur zur groben Orientierung über die Vitalität geeignet
Thymidintransport	Als integraler Membranparameter geeignet, da hohe Sensitivität und direkte Beziehung zum Zustand der Zellmembran

5. Die Uridinaufnahme als mögliches Vitalitätskriterium isolierter Hepatozyten

Uridin spielt im Stoffwechsel ruhender Hepatozyten eine sehr bedeutende Rolle. Hierin unterscheidet es sich grundlegend von Thymidin, das von Hepatozyten in der G₀-Phase nicht benötigt wird (19).

Unter der Voraussetzung, daß Uridin von Hepatozyten aufgenommen und intrazellulär metabolisiert, d.h. überwiegend phosphoryliert wird, kann angenommen werden, daß durch die Bestimmung der Aufnahme und Metabolisierung von Uridin in isolierten Hepatozyten Aussagen über die Vitalität sowohl hinsichtlich des Stoffwechselzustandes als auch bezüglich der Membranintegrität möglich werden. Als Parameter dienen für den Stoffwechselzustand die Phosphorylierungsrate bzw. für die Membranintegrität sowohl der Einwärtstransport von Uridin als auch der Auswärtstransport von intrazellulär gebildeten Uridinphosphaten, welche die Plasmamembran normalerweise nicht permeieren können.

Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Vitalitätskriterien wären somit gleichzeitig Aussagen über den Stoffwechsel sowie über integrale und nichtintegrale Membraneigenschaften möglich.

5.1. Derzeitige Kenntnisse über die Aufnahme von Uridin

Untersuchungen über die Uridinaufnahme in ruhende Hepatozyten wurden von Baur et al. durchgeführt (6). Sie fanden eine linear verlaufende Uridinaufnahme während einer 40-minütigen Inkubation von Hepatozyten mit ¹⁴C-Uridin.

Sechs Stunden bei 4 °C gelagerte Zellen enthielten am Ende der Inkubationszeit intrazellulär mehr als 40 % weniger Radioaktivität pro mg Zellprotein als frische Zellen. Störung der mitochondrialen Atmung durch Antimycin blockierte die Uridinaufnahme fast vollständig.

Bei Novikoff-Hepatoma-Zellen wurde eine konzentrationsabhängige Uridinaufnahme festgestellt. Während 20 Minuten Inkubationsdauer mit ^3H -Uridin in Konzentrationen von 100, 10 und 0,5 $\mu\text{mol/l}$ wurden 160, 45 und 5,5 $\text{pmol}/10^6$ Zellen aufgenommen (55).

Als Transportkonstante K_T wird für Embryonalzellen von Huhn, Maus, Hamster und Ratten sowie für Novikoff-Hepatoma-Zellen ein Bereich von 8-20 $\mu\text{mol/l}$ angegeben.

Aus Untersuchungen an verschiedenen Zellarten sowie an *Escherichia coli* geht hervor, daß mindestens zwei Transportsysteme für Pyrimidinnukleoside existieren (19, 48, 52). Die Uridinaufnahme ließ sich kompetitiv sowohl durch Pyrimidin-derivate wie Cytidin oder Thymidin als auch durch Purinderivate (Adenosin, Guanosin, Inosin) hemmen (54, 48).

Zusammenfassend läßt sich für die Uridinaufnahme somit feststellen:

- Es existieren mindestens zwei Transportsysteme
- Die Uridinaufnahme ist konzentrationsabhängig und folgt einer Michaelis-Menten-Kinetik
- K_T liegt im $\mu\text{molaren}$ Bereich
- Die Aufnahme ist durch andere Nukleoside kompetitiv hemmbar.

5.2. Derzeitige Kenntnisse über den Uridinmetabolismus

Uridin wird intrazellulär durch spezifische Kinasen unter ATP-Verbrauch phosphoryliert unter Bildung von Uridintriphosphat über die Zwischenstufen des Mono- und Diphosphats (19).

Wie Untersuchungen an Novikoff-Hepatoma-Zellen zeigten, liegt UTP intrazellulär in zwei Pools, im Zytoplasma bzw. im Zellkern vor. Aus diesen Pools werden die Uridinnukleotide in

die RNS-Synthese eingespeist, wofür ca. 25 % des intrazellulären Vorrats an Uridinnukleotiden benötigt werden (19).

Bei Mäuseosteoblasten wurde in kleinem Umfang (2-5 % der eingesetzten Menge) auch eine Inkorporation von ^3H -Uridin in die DNS beobachtet. Dies ist dadurch erklärbar, daß als wesentliche Bestandteile des sogenannten "salvage pathways" UTP zu dCTP bzw. UDP zu dTMP - beides Vorstufen der DNS-Synthese -, umgewandelt werden können (64) (Abb. 4).

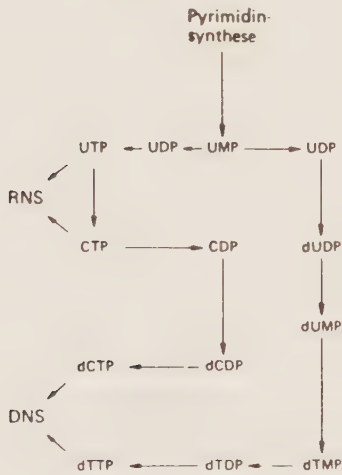


Abbildung 4: Teilübersicht des Stoffwechsels von Uridinnukleotiden

(nach 36)

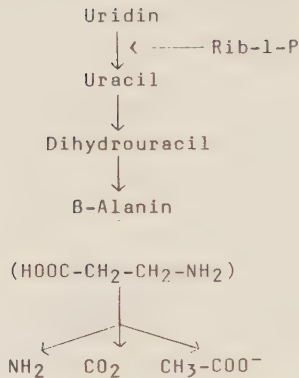


Abbildung 5: Uridinabbau

(nach 36)

Beim Abbau von Uridin entsteht über die Nukleobase Uracil B-Alanin (Abb. 5). Aus in-vivo-Untersuchungen ergab sich, daß 95 % von i.v. injiziertem ^3H -Uridin in der Leber binnen 45 min. zu Alanin und $^3\text{H}_2\text{O}$ abgebaut waren; 5 % wurden zu nicht identifizierten Metaboliten verarbeitet (19).

Im Gegensatz zu Thymidin wird Uridin auch in nicht-teilungsaktiven Leberzellen als wesentlicher Baustein der m-RNS-Synthese und damit als eine Voraussetzung für die umfangreiche hepatozelluläre Proteinsynthese benötigt.

An isolierten Hepatozyten in der G_0 -Phase liegen jedoch bisher keine detaillierten Untersuchungen über Aufnahme, Auswärtstransport sowie Phosphorylierungsmuster von Uridin vor.

6. Problemstellung

Die derzeit bekannten Vitalitätskriterien für isolierte Hepatozyten sind in ihrer Aussagekraft limitiert (6, 47, 8, 73a).

In der vorliegenden Arbeit soll geklärt werden, ob der Uridintransport und -metabolismus geeignet ist, die Vitalität isolierter Hepatozyten sensitiv sowohl auf der Ebene der Plasmamembranintegrität als auch im Hinblick auf den metabolischen Zustand wiederzugeben.

Hierbei sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

- Über welche Transportmechanismen wird Uridin in Hepatozyten aufgenommen?
- In welchem Umfang wird Uridin in der Leberzelle zu entsprechenden Nukleotiden weiter metabolisiert?
- Wieviel der als ^3H -Uridin aufgenommenen Radioaktivität kann die Zelle wieder verlassen und wie verteilt sich die freigesetzte Radioaktivität auf freies Uridin und seine verschiedenen Nukleotidfraktionen?
- Welchen Veränderungen unterliegt bei verschiedenen Zellschädigungen einerseits die Gesamtaufnahme und der Auswärtstransport insbesondere von ^3H -Uridinnukleotiden als Maß für die Integrität der Plasmamembran und andererseits die Phosphorylierung von Uridin als Ausdruck der metabolischen Leistungsfähigkeit der Zelle?
- Wie stellt sich die Aussagekraft von Uridinaufnahme, -freisetzung und -metabolisierung als Vitalitätskriterium im Vergleich zu den "klassischen" Parametern Trypanblauindex, intrazellulärer Kaliumgehalt und Laktat/Pyruvat-Quotient unter den gegebenen Schädigungsbedingungen dar?

METHODIK

7. Isolierung von Leberparenchymzellen

7.1. Tiermaterial

Es wurden männliche Wistar-Ratten aus institutseigener konventioneller Zucht verwendet. Die Tiere waren 3-6 Monate alt und wogen 250-450 g. Futter (Altromin^R) und Wasser standen ad libitum zur Verfügung.

7.2. Hepatozytenisolierung

Die Gewinnung isolierter Hepatozyten erfolgte nach einer von Baur et al. (6) entwickelten Methode. Dabei wurden einige Modifikationen vorgenommen, um die Ausbeute an intakten Zellen zu erhöhen.

Versuchsbeginn war immer zwischen 8.30 und 10.30 Uhr morgens. Die Leberentnahme fand unter Ethernarkose des Versuchstieres statt.

Den Ratten wurden ca. 30 I.E. Heparin in die Vena femoralis injiziert. Nach Eröffnung der Bauchhöhle wurde die Vena portae kanüliert. Nach dem Anschneiden der Vena cava caudalis wurde die Leber in porto-cavaler Richtung mit 50 ml calciumfreien modifiziertem Hankspuffer (nach p. 95 in 51), der mit einem Gasgemisch aus 5 % CO₂ und 95 % O₂ gesättigt war, im offenen System entblutet. Der Puffer setzte sich wie folgt zusammen: 7,1 g NaCl/l; 0,2 g MgSO₄·7 H₂O/l; 0,2 g KCl/l; 0,32 g KH₂PO₄/l; 1,5 g NaHCO₃/l, pH-Wert 7,4.

Nach dem Entbluten der Leber in situ wurde der Thorax eröffnet. Nun wurde die Vena cava knapp kaudal des Her-

zens kanüliert. Die Vena cava caudalis wurde cranial der Abzweigung zur Niere mit einer Ligatur abgebunden. Dann wurde die Leber exenteriert und an eine Perfusionsapparatur nach Miller et al. (45) angeschlossen. Nach Vorperfusion mit 60 ml Hankspuffer bei 37 °C und pH 7,4 in offenes System, wurde mit 70 ml Hankspuffer bei 37 °C und pH 7,4 im geschlossenen System weiterperfundiert. Dem Perfusionsmedium wurde Collagenase in einer Menge von 27-30 mg/70 ml Hankspuffer je nach Aktivität der einzelnen Charge zugesetzt.

Die Durchflußrate betrug 4-5 ml/(min x g Leber). Der Staudruck durfte 7 cm·H₂O nicht übersteigen.

Wenn nach 20-30 min. rezirkulierender Perfusion die Leber weich und brüchig wurde und sich vergrößerte, wurde die Perfusion beendet. Die Leber wurde zunächst mit der Schere in mehrere größere Stücke geschnitten. Anschließend wurde sie unter leichtem Druck in das aufgefangene enzymhaltige Perfusionsmedium ausgestrichen.

Dann wurde die Suspension in einem 500 ml Rundkolben unter Carbogenbegasung in einem auf 37 °C erwärmten Wasserbad 5 min. langsam rotiert.

Anschließend wurde die Zellsuspension durch eine doppelte Lage Gaze filtriert. Der in der Gaze verbleibende Rückstand wurde verworfen. Die Zellsuspension wurde in vier 50 ml Zentrifugengläser überführt. Durch 4 min Zentrifugation mit 20 x g bei 4 °C wurden die Leberzellen sedimentiert.

Das Zellpellet wurde zweimal bei 4 °C in Earle's Salzlösung mit 1,5 % (g/v) Rinderserumalbumin gewaschen. Die Zentrifugation erfolgte wie oben beschrieben.

Zusammensetzung der Salzlösung nach Earle (51): 6,8 g NaCl/l; 0,4 g KCl/l; 0,2 g MgSO₄·7H₂O/l; 0,2 g CaCl₂·2H₂O/l; 1,4 g NaH₂PO₄/l; 2,2 g NaHCO₃/l; pH-Wert 7,4.

Dieser Lösung wurden noch 15 g Albumin/l zugesetzt.

Nach dem Waschen wurde das Zellpellet in Eagle's Minimum Essential Medium (p. 108 in 51) mit anorganischen Salzen modifiziert nach Earle (51) aufgenommen. Die Zelldichte wur-

de auf ca. 100 mg Zellnaßgewicht/ml Zellsuspension (= ca. 7×10^6 Zellen/ml Zellsuspension) eingestellt.

Alle für die Zellpräparation verwendete Glaswaren und das Präparierbesteck waren mit 180 °C warmer Heißluft mindestens 3 Stunden lang sterilisiert worden. Für die Präparation wurden nur frisch hergestellte und sterilfiltrierte Lösungen verwendet.

Soweit nicht anders beschrieben, wurden für die Untersuchungen nur Zellen verwendet, deren Anfärbbarkeit mit Trypanblau unter 12 % lag. Die Inkubation erfolgte in einem Rundschüttelwasserbad (Model 76, New Brunswick Scientific Co., Inc. New York) mit 120 Umdrehungen pro Minute, bei 37 °C und unter Carbogenbegasung. Vor Beginn der Experimente wurden die Zellen 15 min unter diesen Bedingungen inkubiert.

8. Analytische Methoden

8.1. Trypanblaufärbung

10 µl einer 2%igen wässrigen Trypanblaulösung wurden mit 100 µl Hankspuffer verdünnt. 10 µl der Zellsuspension wurden dazugegeben und vermischt. In einer Fuchs-Rosenthal-Zählkammer wurde lichtmikroskopisch bei 40facher Vergrößerung der Prozentsatz blau angefärbter Zellen durch Auszählung von mindestens 300 Zellen ermittelt. Gemäß einer Empfehlung von Ungemach (66) wurden auch Zellen, die nur gefärbte Kerne aufwiesen, als gefärbt bewertet.

8.2. Bestimmung des Proteingehalts

Der Proteingehalt wurde colorimetrisch mit einer modifizierten Biuret-Reaktion und Rinderserumalbumin als Standard ermittelt (58).

8.3. Messung von Laktat und Pyruvat

Im Inkubationsmedium wurden der L-(+)-Laktat- und der Pyruvatgehalt enzymatisch mit Laktatdehydrogenase in einem Eppendorf-Photometer bestimmt (7).

8.4. Ermittlung des intrazellulären Kaliumgehaltes

Der Kaliumgehalt von Hepatozyten wurde nach zweimaliger Waschung mit Tris-HCl-Puffer (150 mmol/l, pH 7,4, 37 °C) im Perchlorsäureüberstand flammenphotometrisch gemessen (Instrumentation Laboratory, Flame photometer IL 243).

8.5. Messung der Uridinaufnahme in isolierte Hepatozyten

Die Transportmessungen wurden in einem Puffer nach Earle (51) durchgeführt.

8.5.1. Konzentrationsabhängiger Uridintransport

Wie in Abb. 6 dargestellt, wurden jeweils 0,8 ml der erwärmten Zellsuspension in vorgewärmte (37 °C) Reaktionsgefäße überführt (= Inkubationsbeginn). In diesen Gefäßen befand sich ^3H -Uridin in steigenden Mengen. Die Endkonzentrationen betrugen 0,4, 0,8, 1,5, 3, 5, 10, 15, 20, 100, 300, 500, 700, 1000, 1300 μmol Uridin/l Zellsuspension. Das Inkubationsvolumen, bestehend aus ^3H -Uridinlösung + Zellsuspension, betrug 1 ml.

Ab einer Konzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ wurde radioaktiv markiertes Uridin mit nicht markiertem Substrat in entsprechender Menge vermischt.

58 und 62 Sekunden nach Inkubationsbeginn wurde die Reaktion durch Vermischen von jeweils 0,2 ml der Zellsuspension mit 1 ml eiskaltem Hankspuffer gestoppt.

Die Zellen wurden durch 5 s Zentrifugation bei 15000 x g vom Inkubationsmedium getrennt. 0,2 ml des Überstandes wurden zur Bestimmung der Radioaktivität des Inkubationsmediums in 3,5 ml Szintillator überführt (extrazelluläre Radioaktivität).

Das Zellpellet wurde 2 mal mit eiskaltem Hankspuffer gewaschen. Dann wurden die Zellen mit 1 ml eiskalter Trichlor-essigsäure (1 mol/l) ausgefällt. Alle diese Vorgänge waren innerhalb 30 - 45 s beendet.

Nach 4 min Zentrifugation bei 15 000 xg wurden von dem Überstand, der die säurelöslichen Bestandteile der Zellen, wie z.B. freie Nukleoside und Nukleotide, enthielt, jeweils 0,1 ml in 3,5 ml Szintillator überführt zur Radioaktivitäts-

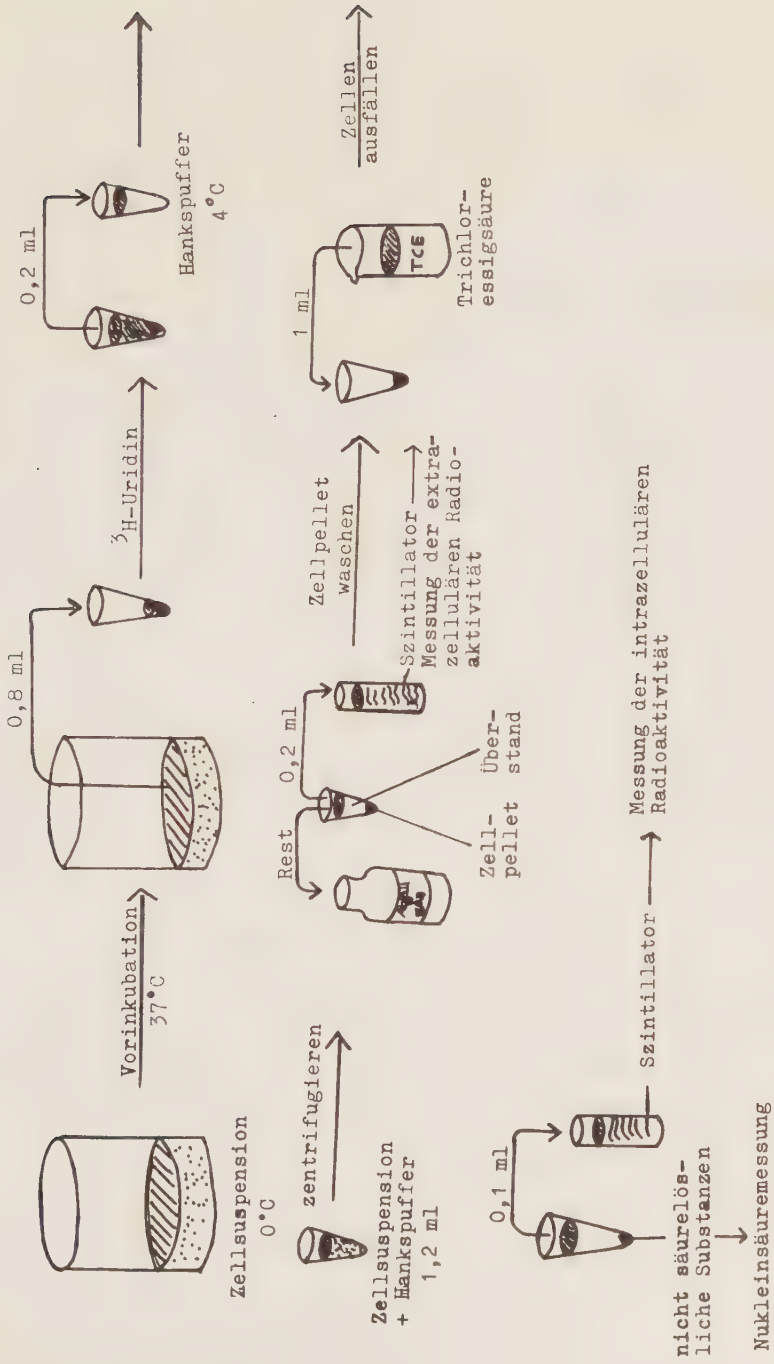


Abbildung 6: Schematischer Versuchsablauf beim Konzentrationsabhängigen Uridintransport

messung (freie intrazelluläre Radioaktivität).

Die Menge an intra- und extrazellulären radioaktiv markiertem Uridin wurde in einem Flüssigszintillationszähler mit Quenchkorrektur über das Kanalverhältnis eines externen Standards bestimmt. Die Zerfälle pro Minute wurden über die spezifische Aktivität der Uridinlösung in pmol Uridin/ μ l Zellvolumen bzw. je μ l Inkubationsmedium umgerechnet.

Für jede Zellsuspension wurde der Nukleinsäuregehalt pro 10^6 Zellen ermittelt. Aus diesem Wert konnte für jede Einzelmessung anhand des jeweils gemessenen Nukleinsäuregehalts die Zellzahl errechnet werden. Unter Zugrundelegung des von Ungemach ermittelten mittleren intrazellulären Volumens isolierter Hepatozyten von $3,14 \mu\text{l}/10^6$ Zellen (66) konnte somit der Anteil des intrazellulären Wasserraums abgeleitet werden.

Die Bestimmung des Nukleinsäuregehalts des Zellpellets erfolgte aus den nicht säurelöslichen Bestandteilen der mit 10 % TCE bei 4°C gefällten Zellen. Nach 4 min Zentrifugation bei $15\,000 \times g$ wurde das Zellpellet zweimal mit 6 % TCE gewaschen und sodann einer 30 minütigen sauren Hydrolyse bei 70°C im Wasserbad unterzogen. Der Nukleinsäuregehalt der hydrolysierten Proben wurde zunächst photometrisch als Extinktion bei 260 nm ermittelt und anschließend mittels einer Eichkurve quantitativ umgerechnet.

8.5.2. Zeitabhängiger Uridintransport

Die Zellsuspension wurde mit ^3H -Uridin in einer Konzentration von $0,6 \mu\text{mol/l}$ Inkubationsmedium vermischt. Es erfolgten Probenentnahmen nach der bei 2.5.1. beschriebenen Vorgehensweise zu folgenden Zeitpunkten (gemessen ab Inkubationsbeginn mit dem Substrat): 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20 min.

8.6. Auswärtstransport von Uridin und -metaboliten

Für diese Experimente wurden die Zellen zuerst mit ^3H -Uridin beladen. Hierzu erfolgte eine 15-minütige Inkubation mit $0,6 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ^3H -Uridin. Nach Ablauf dieser Vorinkubation wurden die Zellen nach Zentrifugation mit $15\,000 \times g$ vom radioaktiven Inkubationsmedium durch zweimaliges Waschen mit eiskaltem Hankspuffer getrennt. Das Zellpellet wurde dann in 37°C warmen Hankspuffer ^3H -Uridin-freiem Hankspuffer mit $100 \text{ } \mu\text{mol/l}$ unmarkiertem Uridin resuspendiert.

Die erste Probe -, Probenvolumen 1 ml - wurde unmittelbar nach dem Waschen genommen. Die weiteren Probeentnahmen erfolgten 30 min bzw. 60 min nach der Waschung. Der nach TCE-Fällung säurelösliche Zellinhalt sowie das Inkubationsmedium wurden lyophilisiert und anschließend tiefgefroren.

Vor der radiometrischen Messung wurde die Radioaktivität in den Lyophilisaten hochdruckflüssigkeitschromatographisch wie unter 8.7. beschrieben in Nukleoside und Nukleotide aufgetrennt.

8.7. Chromatographische Auftrennung von Uridin und -metaboliten

Die Auftrennung von Uridin und entsprechender Mono-, Di- und Triphosphate erfolgte durch eine von Altschuh (2) entwickelte hochdruckflüssigkeitschromatographische Methode. Als Matrix wurde eine Aminex-A27-Säule der Fa. Knauer, Berlin, mit einer Korngröße von $13 \text{ } \mu\text{m}$ verwendet. Der Eluent bestand aus Wasser mit $1,0 \text{ N}$ Ammoniumformiatpuffer, $\text{pH } 3,5$.

Das Verhältnis Wasser : Formiatpuffer veränderte sich nach 10 min Vorlauf mit reinem Wasser in einem exponentiell ansteigenden Gradienten innerhalb von 70 min von $100 : 0$ auf $30 : 70$. Die Fließgeschwindigkeit betrug 1 ml/min . Das Eluat wurde in 45 Fraktionen mit einer Sammeldauer von jeweils 2 min aufgefangen.

Nach Zusetzen von 3 ml Szintillationscocktail wurde die Radioaktivität der einzelnen Fraktionen im Szintillationszähler ermittelt. Die Quenchkorrektur erfolgte nach der Methode der "external standard ratio". Die qualitative Zuordnung der Fraktionen zu entsprechenden Nukleosiden und Nukleotiden erfolgte mit Hilfe der Retentionszeiten von Reinsubstanzen. Die Retentionszeiten wurden photometrisch bei 260 nm durch Spiken der Proben mit nicht radioaktiv markierten Nukleosiden und Nukleotiden ermittelt.

Anhand der spezifischen Radioaktivität von ^3H -Uridin erfolgte die Quantifizierung aus der Summe der Radioaktivität der einzelnen zu bestimmten Peaks zuordenbaren Fraktionen. Abb. 8 stellt ein Standardchromatogramm von Uridin und seinen Nukleotiden dar, das unter den angegebenen Bedingungen erhalten wurde.

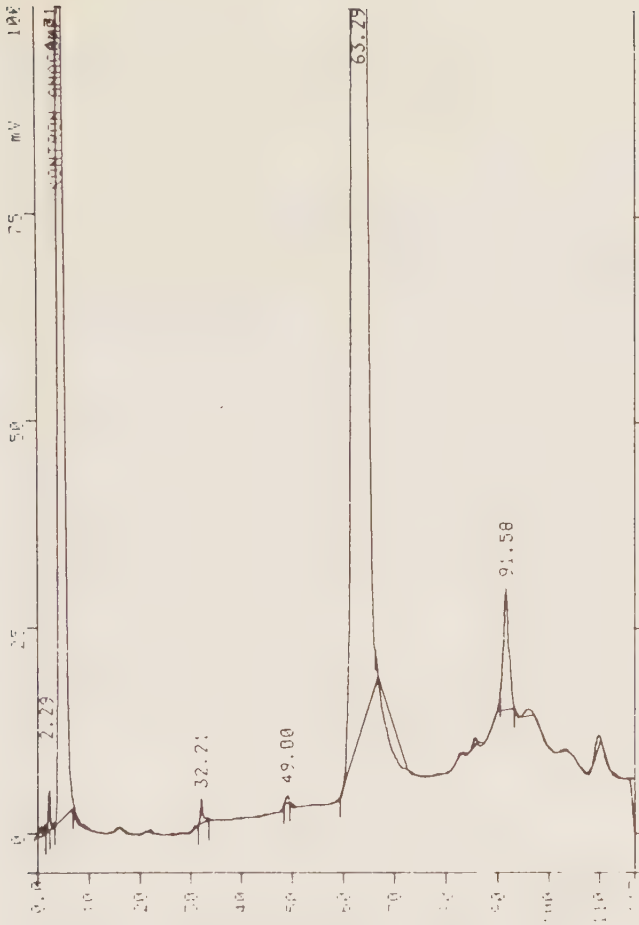


Abbildung 8: Chromatogramm von Uridin und seinen Phosphaten

Die Abszisse gibt die Dauer des Laufs in Minuten an. Zahlen über oder neben den Peaks geben an, zu welchem Zeitpunkt des Laufs die jeweilige Substanz eluiert wurde (= Retentionszeit).

Retentionszeit (min)	Substanz
4,31	Uridin
32,21	UMP
63,29	UDP
91,58	UTP

9. Schädigung der Leberzellen

9.1. Anoxie

Hierzu wurden die Zellen nach der Vorinkubation mit N_2 anstelle von Carbogen über den gesamten Versuchszeitraum begast. Ein Teil der Zellen wurde als Kontrolle mit Carbogen weiterbegast.

9.2. Mechanische Schädigung

Hierzu wurden die Zellen nach der Vorinkubation im Rundschüttelwasserbad in ein Schüttelwasserbad mit alternierenden Schüttelbewegungen in einer Frequenz von 240/min verbracht.

Ein Teil der Zellen verblieb als Kontrolle im Rundschüttelwasserbad unter den unter 7.2. beschriebenen Bedingungen.

10. Statistische Analyse

Aus den Einzelwerten einer Gruppe wurde das arithmetische Mittel mit seiner Standardabweichung s_{n-1} nach der Formel

$$s_{n-1} = \sqrt{\frac{(x - \bar{x})^2}{n-1}}$$

x: Einzelwert

$\bar{x}$: arithmetisches Mittel

n: Anzahl der gemessenen
Werte

errechnet.

Die Prüfung auf die Unterschiedlichkeit zweier unabhängiger Meßreihen wurde mit Hilfe des t-Tests durchgeführt. Die Signifikanzschwelle lag bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % ($p \leq 0,05$).

Regressionsanalyse und Errechnung der Korrelationskoeffizienten erfolgten nach der Methode der kleinsten Quadrate.

11. Verwendete Substanzen und Reagentien

Substanz	Herkunft
Albumin aus Rinderserum (Fraktion V)	Sigma
Carbogen	Linde
Collagenase (Clostridiopetidase A, E. C. 3.4.4.19)	Boehringer
Ether zur Narkose	Hoechst
L-Laktatdehydrogenase	Sigma
B-NAD	Sigma
B-NADH	Sigma
Stickstoff	Linde
Szintillator "Readysolv MP"	Beckman Instruments
Uridin, UMP, UDP, UTP	Sigma
5- ³ H-Uridin 4,7 Ci/mmol	Amersham Buchler
5 Ci/mmol	
29 Ci/mmol	
	New England Nuclear

Alle anderen verwendeten Substanzen wurden von der Firma Merck bezogen.

ERGEBNISSE

12. Kalium-Gehalt, Laktat-Pyruvat-Quotient und Trypanblau-anfärbbbarkeit ungeschädigter Hepatozyten

Die Bestimmungen erfolgten in einer Zellsuspension mit einer Dichte von ca. 100 mg Naßgewicht/ml in MEM bei 37 °C unter Carbogenbegasung.

Die in Tab. 4 gefundenen Werte stimmen im wesentlichen mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen überein (6, 45a). Nach einer Gesamtinkubationsdauer von 140 min. hatten sich die hier untersuchten Vitalitätskriterien nur unwesentlich verändert. Somit sind hinsichtlich dieser Parameter aussagefähige Versuchsergebnisse bei einer Inkubationszeit von mindestens zwei Stunden zu erwarten.

Tabelle 4: Vitalitätskriterien isolierter Hepatozyten

	0 min	120 min
Trypanblau (% anfärbbare Zellen)	10,3 ± 2,17	9,0 ± 4,06
Intrazelluläre K ⁺ -Konz. (mmol/l)	134,4 ± 19,42	131,2 ± 24,20
Laktat/Pyruvat-Quotient	7,8 ± 2,00	11,6 ± 3,50

Die erste Bestimmung fand nach 20-minütiger Vorinkubation statt (0min). Die Werte sind Mittelwerte (Doppelbestimmungen) ± Standardabweichung aus 4 Versuchen.

Die geringe Anfärbbbarkeit mit Trypanblau zeigt, daß die Zellmembran keine schwerwiegenden strukturellen Defekte während der Hepatozytenisolierung erlitten hat. Auch die intrazelluläre Kalium-Konzentration spricht für die funk-

tionelle Intaktheit der Membran, die noch eine mehr als 25-fache intrazelluläre Anreicherung von Kalium ermöglicht. Der Laktat-Pyruvat-Quotient mit Werten um 10 läßt auf einen ausreichenden Redoxstatus der Hepatozyten schließen.

13. Vitalitätskriterien bei mechanischer Schädigung von Hepatozyten

Bei erhöhter mechanischer Belastung von Hepatozyten entsprechend den unter 9.1.2. beschriebenen Bedingungen reagierten

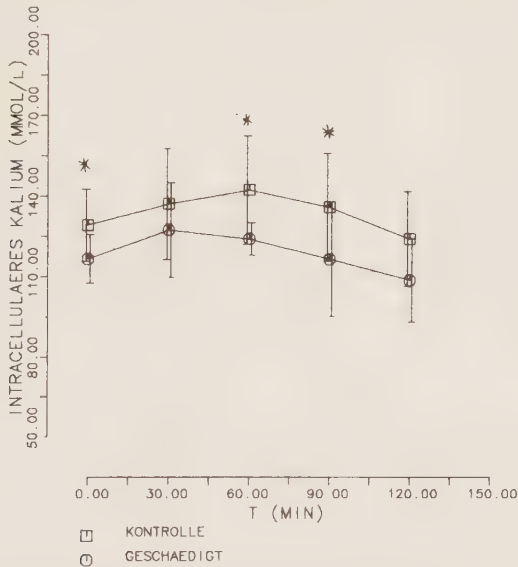


Abbildung 9: Intrazellulärer Kaliumgehalt mechanisch geschädigter Hepatozyten

- * Hepatozyten mit signifikant höherer Anfärbbarkeit ($p \leq 0,05$) als geringer mechanisch belastete Kontrollzellen. Die Werte sind Mittelwerte aus 4 Versuchen $\pm$ Standardabweichung.

der Trypanblautest und der intrazelluläre Kaliumgehalt mit vergleichbarer Sensitivität. Beide Parameter zeigten deutliche, teilweise signifikante Abweichungen von den Werten geringer belasteter, "ungeschädigter" Kontrollzellen (Abb. 9 und 10). Eine andernorts beschriebene Korrelation zwischen den Trypanblauanfärbbarkeit und dem Kaliumgehalt (63) wurde bestätigt.

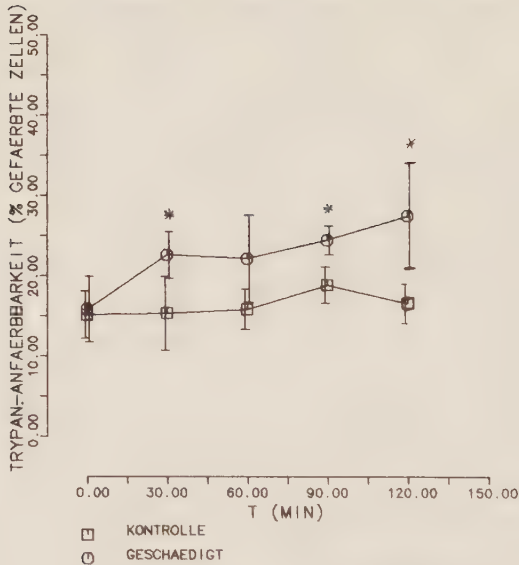


Abbildung 10: Trypanblau-Anfärbbarkeit mechanisch geschädigter Hepatozyten

* Hepatozyten mit signifikant niedrigeren intrazellulären Kaliumgehalt ($p \leq 0,05$) als die geringer mechanisch geschädigte Kontrollzellen. Die Werte sind Mittelwerte aus 4 Versuchen $\pm$ Standardabweichung.

Es ergab sich ein Spearman's Korrelationskoeffizient von 0,587 mit $p \ll 0,05$, der aus den Rangzahlen von 16 Wertepaaren errechnet wurde, welche für Abb. 11 verwendet wurden (70).

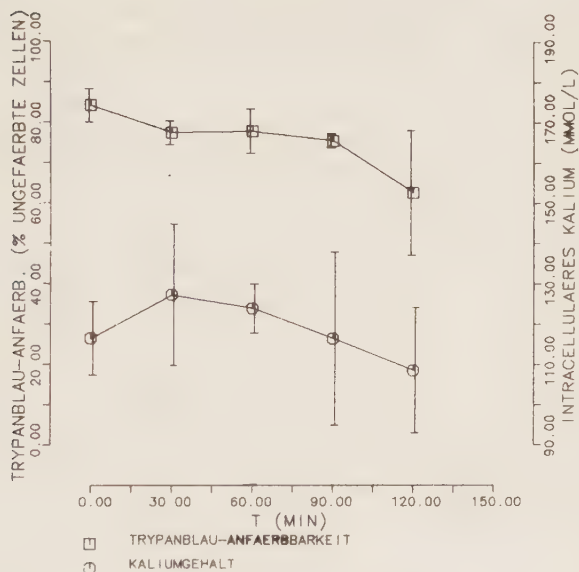


Abbildung 11: Vergleich der zeitabhängigen Veränderungen des intrazellulären Kaliumgehalts und der Trypanblauanfärbbbarkeit bei mechanischer Schädigung von Hepatozyten

Zwischen beiden Parametern besteht bei mechanischer Schädigung eine positive Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten $r = 0,587$, errechnet aus Spearman's Rangkorrelationen. Die Werte sind Mittelwerte aus 4 Versuchen $\pm$ Standardabweichung.

Der Laktat-Pyruvat-Quotient (Abb. 12) hingegen läßt keinerlei Aussage hinsichtlich einer Zellschädigung zu.

Zu keinem Zeitpunkt bestand ein auffälliger Unterschied zu Kontrollzellen; es konnte auch keine Tendenz zu Veränderungen in irgendeiner Richtung festgestellt werden. Der Laktat/Pyruvat-Quotient bewegte sich während der gesamten Inkubation im Normbereich der Kontrolle und erweist sich demzufolge im Gegensatz zum Trypanblauindex und intrazellulärem Kaliumgehalt als nicht beeinflussbar durch mechanische Schädigung unter den gegebenen Bedingungen.

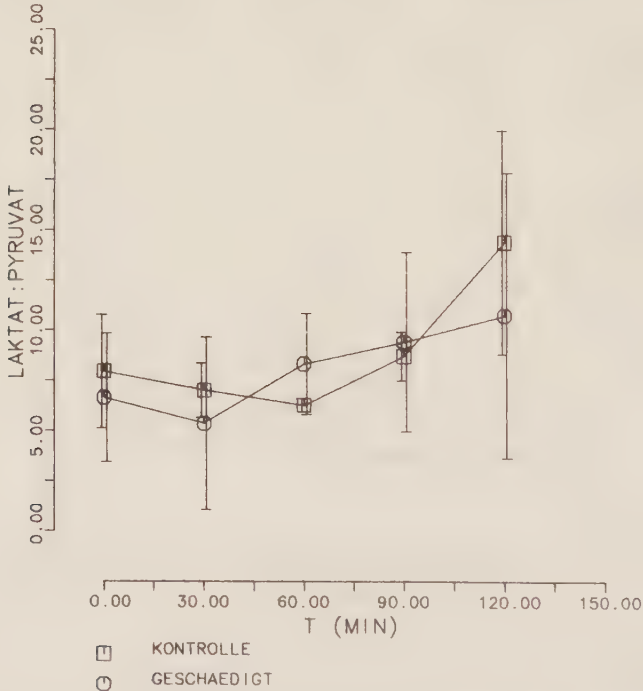


Abbildung 12: Laktat-Pyruvat-Quotient mechanisch geschädigter Hepatozyten

Die Werte sind Mittelwerte aus 4 Versuchen $\pm$ Standardabweichung.

14. Vitalitätskriterien isolierter Hepatozyten bei O₂-Mangel

Um den Einfluß unterschiedlicher O₂-Spannungen auf die Vitalität isolierter Hepatozyten zu untersuchen, wurde die Zellsuspension in drei Ansätzen jeweils unter Carbogen, atmosphärischer Luft bzw. Stickstoff inkubiert, wodurch sich O₂-Anteile von 95 : 21 : 0 % ergaben.

Ergebnisse wonach hypoxische Hepatozyten keine Vitalitäts-einbußen erleiden sollen (14), konnten hierbei nicht bestätigt werden.

Wie aus Abb. 13, 14 und 15 ersichtlich ist, kommt es mit abnehmenden O₂-Gehalten zu deutlichen Veränderungen des intrazellulären Kalium-Gehalts, der Trypanblauanfärbbarkeit sowie des Laktat-Pyruvat-Quotienten.

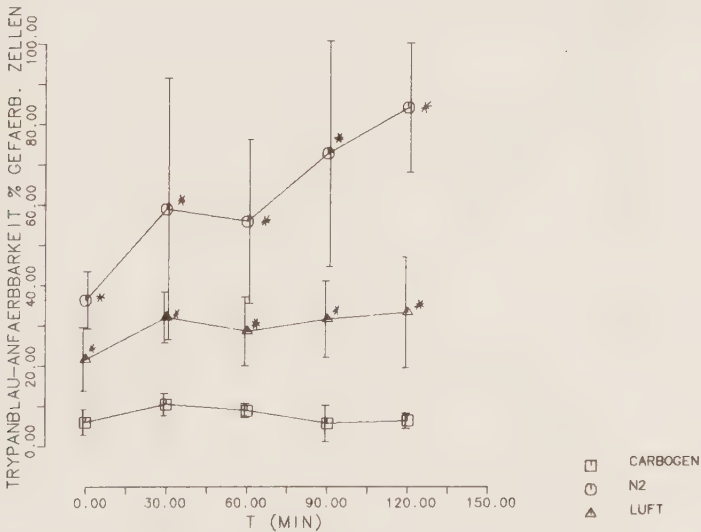


Abbildung 13: Trypanblauanfärbbarkeit isolierter Hepatozyten bei O₂-Mangel

* Werte unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) von den Carbogen-begasteten Kontrollen. Die Werte sind Mittelwerte aus 4 Versuchen $\pm$ Standardabweichung.

Die hypoxisch bedingte Zellschädigung zeichnete sich bereits nach Ablauf der Vorinkubation ab und war umso stärker ausgeprägt, je niedriger das Sauerstoffangebot für die Zellen war. Unter Luftbegasung änderte sich der initial schlechtere Vitalitätszustand hinsichtlich der Membranintegrität im weiteren Versuchsverlauf nicht mehr. Unter einer N₂-Atmosphäre nahm hingegen die Membranschädigung progressiv zu, so daß am Versuchsende über 80 % der Zellen permeabel für Trypanblau und somit als irreversibel geschädigt zu betrachten waren (Abb. 13).

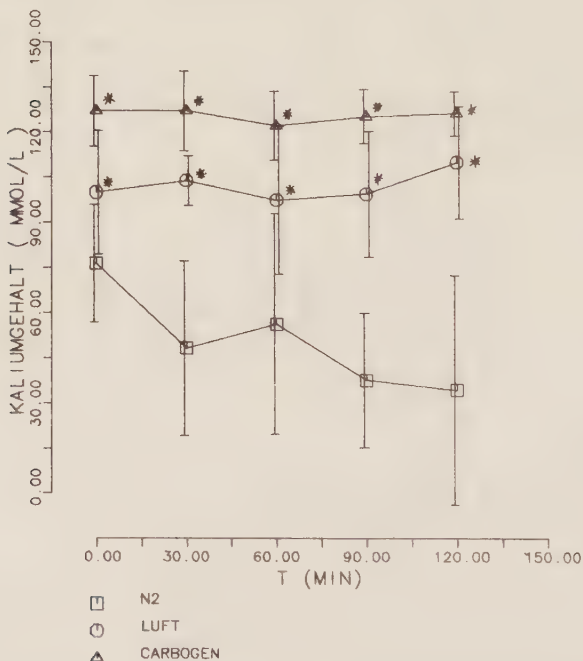


Abbildung 14: Kaliumgehalt isolierter Hepatozyten bei O₂-Mangel

* Hepatozyten mit signifikant niedrigerem K⁺-Gehalt als Kontrollzellen. Die Werte sind Mittelwerte aus 4 Versuchen $\pm$ Standardabweichung.

Mit den morphologischen Schäden ging auch eine Beeinträchtigung funktioneller Membranparameter, gemessen am Beispiel des intrazellulären K^+ -Gehalts einher. Die Zellen waren unter Stickstoff letztendlich nicht mehr in der Lage, Kalium intrazellulär anzureichern (Abb. 14). Sowohl nach Luft- als auch nach N_2 -Begasung ergab sich eine Korrelation der Veränderungen von Trypanblauindex und intrazellulärem K^+ -Gehalt mit einem Spearman's Korrelationskoeffizienten von 0,46 (Luft) bzw. 0,61 (N_2) bei $p \leq 0,05$.

Bei diesen auffälligen Zusammenhängen muß allerdings berücksichtigt werden, daß der Trypanblauindex nur von der strukturellen Intaktheit der Membran beeinflusst wird, während der intrazelluläre K^+ -Gehalt zusätzlich noch vom energetischen Zustand der Leberzellen abhängt. Mit abnehmender O_2 -Versorgung sinkt der ATP-Spiegel, so daß unter den gegebenen Bedingungen die Aktivität der Na^+, K^+ -ATPase zusätzlich und unabhängig von der Membrankonfiguration beeinträchtigt wird.

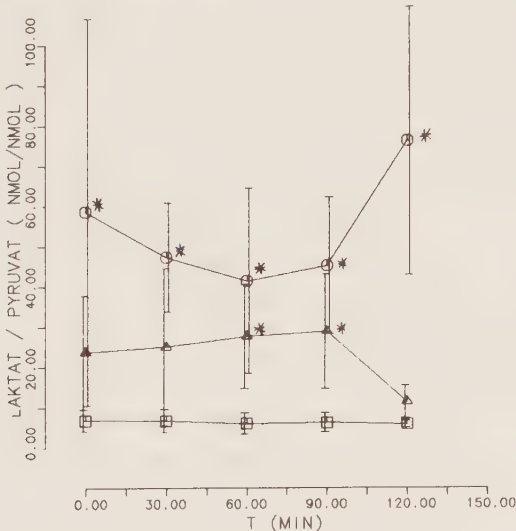


Abbildung 15: Laktat-Pyruvat-Quotient isolierter Hepatozyten bei O_2 -Mangel

* Werte unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$) von den Carbogen-begasteten Kontrollen. Die Werte sind Mittelwerte aus 4 Versuchen $\pm$ Standardabweichung.

Im Gegensatz zu den Untersuchungen bei mechanischer Leberschädigung reagierte der Laktat-/Pyruvat-Quotient sensitiv auf Sauerstoffmangel. Abb. 15 zeigt eine, auch in anderen Untersuchungen (6, 56) beobachtete Zunahme dieses Quotienten mit abnehmender Sauerstoffkonzentration, wobei bereits unter Luftverhältnissen unphysiologisch hohe Werte mit signifikanten Unterschieden zu Carbogen-begasten Kontrollhepatozyten erreicht wurden.

15. Der Uridintransport bei nicht geschädigten Hepatozyten

Um die Aussagekraft der Uridinaufnahme durch Hepatozyten als Vitalitätskriterium für Plasmamembranintegrität und metabolischen Zustand der Zelle prüfen zu können, waren zunächst Voruntersuchungen über die Transportkinetik und anschließende Phosphorylierung des Uridins in isolierten Leberzellen durchzuführen.

15.1. Zeitabhängigkeit des Uridintransport

Voraussetzung für eine eindeutige Beschreibung der konzentrationsabhängigen Transportkinetik ist die Wahl der optimalen Inkubationsdauer der Hepatozyten mit ^3H -Uridin, da sich die Transportkinetik nur während der linearen Phase der Substrataufnahme, solange die Aufnahme rate noch nicht durch Sättigungsprozesse beeinflusst wird, bestimmen läßt.

Hierzu wurde der Zeitverlauf der Uridinaufnahme in Hepatozyten bei einer Konzentration von $0,6 \mu\text{mol } ^3\text{H-Urd/l}$ Inkubationsmedium über einen Zeitraum von 20 min. ermittelt. Um frühzeitig ein Gleichgewicht erkennen zu können, wurde in Anlehnung an die bekannten Daten der Thymidinaufnahme in Hepatozyten (68) eine niedrige, möglichst unterhalb der K_t liegende Substratkonzentration gewählt.

Wie aus Abb. 16 hervorgeht, kam es sehr rasch zu einem intrazellulären Anstieg an radioaktiv markiertem Substrat. Der Anstieg war etwa bis zur 4. Minute linear und ging dann in eine Verlangsamung der Aufnahme rate über. Ein Gleichgewicht konnte jedoch bis zur 20. Minute nicht erreicht werden. Der Grund hierfür ist u.a. in der Tatsache zu suchen, daß bei diesen Experimenten eine mögliche Metabolisierung unberücksichtigt blieb. Die Meßwerte stellen demnach $^3\text{H-Uridin}$ und Folgeprodukte dar.

Um bei den sich anschließenden Experimenten zum konzentrationsabhängigen Transport im linearen Bereich der Uridinaufnahme zu bleiben, wurde eine Inkubationsdauer von 60 s gewählt.

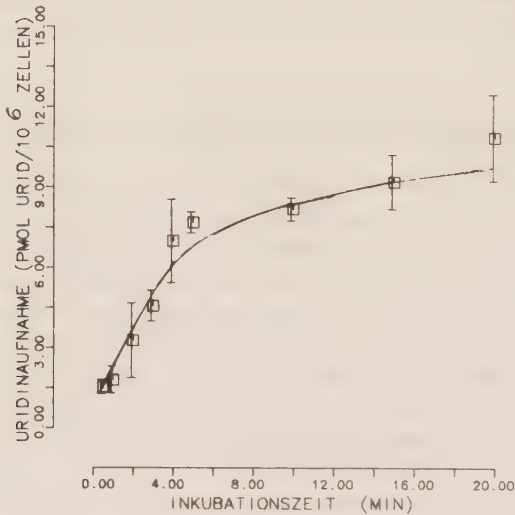


Abbildung 16: Zeitabhängiger ^3H -Uridintransport isolierter Hepatozyten

Hepatozyten wurden mit $0,6 \mu\text{mol } ^3\text{H}\text{-Uridin/l}$ Inkubationsmedium inkubiert. Die Werte sind Mittelwerte aus 4 Versuchen $\pm$ Standardabweichung.

15.2. Konzentrationsabhängigkeit des Uridintransports

Abb. 17 (Kurve I) zeigt, daß konzentrationsabhängige Uridinaufnahme im unteren Konzentrationsbereich bis 20 $\mu\text{mol/l}$ biphasisch verläuft. Eine initiale hyperbole Phase ($<5 \mu\text{mol/l}$) war von einem linearen Prozeß bei höheren Konzentrationen bis in den mmol/l -Bereich (Abb. 18) gefolgt.

Unter der Annahme, daß die initiale Phase einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt, während der lineare Anteil eine Kinetik 0-ter Ordnung darstellt und somit zur Substratkonzentration direkt proportional ist, kann der gesamte Aufnahme-prozeß mit folgender Gleichung beschrieben werden (84):

$$v = \frac{V \times S}{S + K_T} + k \times S$$

hyperbole Phase linearer Anteil

v = Aufnahmerate $[\text{pmol}/(10^6 \text{ Zellen} \times \text{s})]$ bei einer vorgegebenen Konzentration S $[\mu\text{mol/l}]$

V = maximale Aufnahmerate des sättigbaren Anteils der Gesamtaufnahme $[\text{pmol}/(10^6 \text{ Zellen} \times \text{s})]$

K_T = Substratkonzentration $[\mu\text{mol/l}]$ bei der die halbmaximale Aufnahmerate erreicht wird (entspricht der Michaelis-Konstante K_m)

k = Proportionalitätskonstante der linearen Phase $[\text{s}^{-1}]$ (entspricht der Geradensteigung)

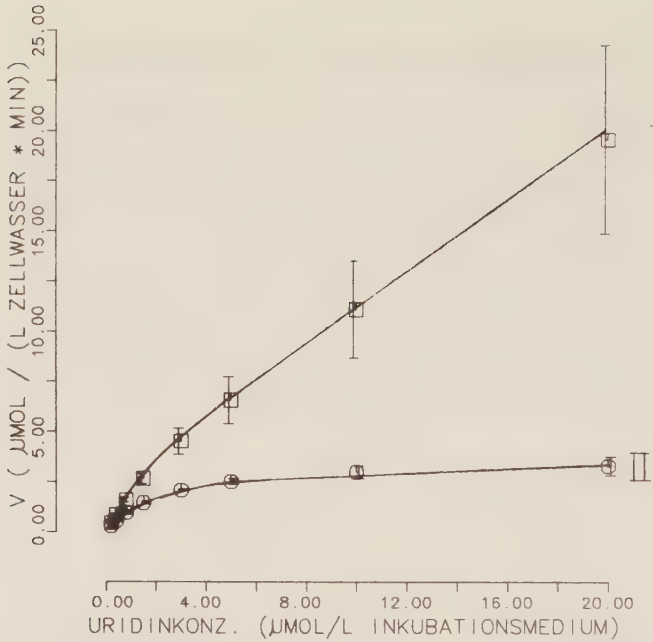


Abbildung 17: Konzentrationsabhängiger ^3H -Uridintransport (unterer Konzentrationsbereich $\leq 20 \mu\text{mol } ^3\text{H}$ -Uridin/l Inkubationsmedium)

Hepatozyten wurden 60 s lang mit ^3H -Uridin in ansteigenden Konzentrationen inkubiert.

Linie I stellt die Gesamtaufnahme dar, Linie II wurde nach Subtraktion des linearen Anteils von der Gesamtaufnahme erhalten.

Die Werte sind Mittelwerte aus 4 Versuchen (Doppelbestimmungen) $\pm$ Standardabweichung.

Durch Subtraktion des Wertes $k \times S$ von der Gesamtaufnahme bei gegebener Konzentration S läßt sich eine hyperbole Kurve errechnen (Abb. 17, Linie II), die der Michaelis-Menten-Kinetik folgt und einen sättigbaren Uridintransport korrigiert um den in diesem Konzentrationsbereich nicht sättigbaren linearen Aufnahmeanteil darstellt.

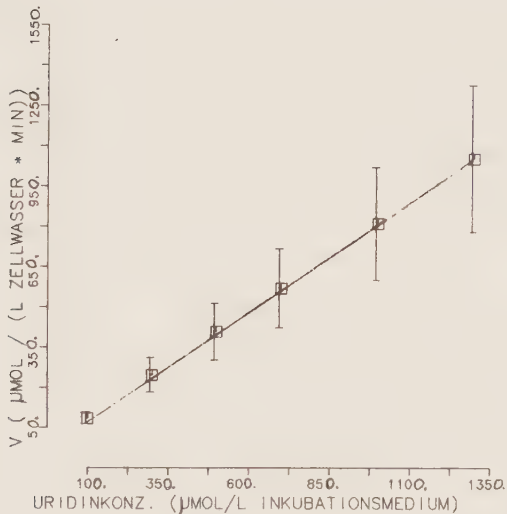


Abbildung 18: Konzentrationsabhängiger ^3H -Uridintransport (höhere Konzentrationen $\gg 100 \mu\text{mol } ^3\text{H}$ -Uridin/l Inkubationsmedium)

Versuchsbedingungen wie bei Abb. 17.

Die kinetischen Konstanten V und K_t wurden jeweils aus der Steigung verschieden linearisierter Darstellungen der Michaelis-Menten-Kinetik der sättigbaren Uridinaufnahme im Hofstee-Diagramm (v gegen v/S) und im Eadie-Hofstee-Diagramm (S/v gegen S) ermittelt. Hierbei resultieren Geraden deren Steigung entweder dem reziproken von V (Hofstee-Diagramm) bzw. dem negativen Zahlenwert von K_t (Eadie-Hofstee-Diagramm) entsprechen.

Tabelle 4: Kinetische Daten der Uridinaufnahme in isolierte Hepatozyten

linearer Anteil ...			sättigbarer Anteil der Uridinaufnahme					
k	SD	n	K_t	SD	n	V_{max}	SD	n
0,81	$\pm 0,213$	5	2,25	$\pm 0,945$	3	3,64	$\pm 0,763$	3

k = Proportionalitätskonstante der linearen (unsättigbaren) Phase [s^{-1}]

K_t = Transportkonstante [$\mu\text{mol/l}$]

V = Maximale Aufnahme rate [$\text{pmol}/(10^6 \text{ Zellen} \cdot \text{s})$]

SD = Standardabweichung

n = Anzahl der zur Berechnung verwendeten Versuche

Die Kinetik der sättigbaren Uridinaufnahme wurde nach Substraktion des linearen Anteils errechnet.

Die kinetischen Daten wurden für jeden Transportversuch gesondert mit einem von Ungemach entwickelten Computerprogramm errechnet und die hierbei erhaltenen kinetischen Konstanten als Mittelwerte $\pm$ S.D. dargestellt.

Die Korrelationskoeffizienten der linearen Regression betrugen für $V \geq 0,90$, $K_t \geq 0,85$, $k \geq 0,96$

Die Ergebnisse zeigen, daß für die Uridinaufnahme in isolierte Hepatozyten bei Substratkonzentrationen bis $1300 \mu\text{mol/l}$ zwei Aufnahmerouten bestehen:

- 1) Ein sättigbarer Transportprozess der einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt und bei dem es sich um ein Carrier-vermitteltes Transportsystem handelt, das optimal in unteren $\mu\text{mol/l}$ -Bereich arbeitet.
- 2) Ein nicht sättigbarer Anteil bei dem es sich entweder um freie Diffusion handelt oder um Prozesse, die erst bei höheren Konzentrationen sättigbar sind, wobei in diesem Zusammenhang möglicherweise die der Aufnahme unmittelbar nachfolgenden stufenweisen Metabolisierungsschritte des Uridins von Bedeutung sind.

15.3. Auswärtstransport von Uridin und -metaboliten

Diese Versuche sollten darüber Aufschluß geben, in welchem Umfang intrazellulär als ^3H -Uridin aufgenommene Radioaktivität die Zelle wieder verlassen kann. Hierbei wird von der bekannten Tatsache ausgegangen, daß aufgrund der Ladungsverhältnisse phosphorylierte Produkte, wie Nukleotide, im Gegensatz zu Nukleosiden die Plasmamembran nicht permeieren können (16). Somit können an diesem "Countertransport" unter Voraussetzung einer weitgehend als Permeationsbarriere noch intakten Plasmamembran nur unverändertes Uridin und eventuell entstandene ungeladene Abbauprodukte teilnehmen.

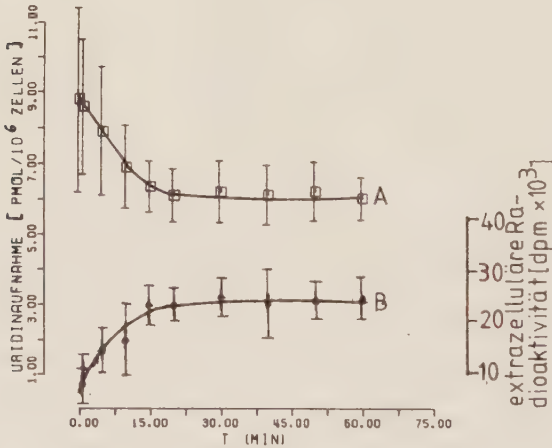


Abb. 21: Abnahme der intrazellulären Radioaktivität von ^3H -Uridin-beladenen Hepatozyten bei Inkubation in ^3H -Uridinfreiem Medium (Kurve A)
Zunahme der extrazellulären Radioaktivität im Inkubationsmedium (Kurve B)
Die Hepatozyten wurden nach 15-minütiger Inkubation mit $0,6 \mu\text{mol } ^3\text{H}\text{-Uridin/l}$ Inkubationsmedium| entsprechend den Angaben unter 8.6 in $^3\text{H}\text{-Uridin}$ -freies Medium mit $100 \mu\text{mol/l}$ unmarkiertem Uridin überführt. Anschließend wurde der zeitabhängige Verlauf der intra- und extrazellulären Radioaktivität bestimmt. Die Werte sind Mittelwerte aus 4 Versuchen $\pm$ Standardabweichung.

Die kontinuierliche Abnahme der intrazellulären Radioaktivität verlangsamte sich erkennbar nach ca. 10 min. (Abb. 21), nach 20 min. kam dieser Vorgang zum Stillstand. Es konnte zu diesem Zeitpunkt kein weiterer Anstieg der extrazellulären Radioaktivität im Inkubationsmedium gemessen werden (Abb. 21).

Nach 20 min. befanden sich noch immer ca. 60 % der als ^3H -Uridin aufgenommenen Radioaktivität in der Zelle und kann deshalb bei intakten Hepatozyten als impermeabel bzw. nicht austauschbar betrachtet werden.

Für den überwiegenden Anteil der freigesetzten Radioaktivität ist anzunehmen, daß er an nicht metabolisiertes Uridin gebunden war und im Rahmen eines Countertransportes im Austausch gegen unmarkiertes Uridin aus den Hepatozyten transportiert wurde, wobei ein Wiedereintritt von ^3H -Uridin aufgrund des hohen extrazellulären Überschusses an unmarkiertem Substrat vernachlässigt werden kann.

16. Uridinmetabolismus

In verschiedenen Zellarten wird Uridin im Anschluß an die intrazelluläre Aufnahme zu phosphorylierten Produkten weitermetabolisiert. Die so entstandenen Nukleotide werden zum Teil in Nukleinsäuren, insbesondere RNA eingebaut (19, 46, 50). Im folgenden sollte untersucht werden, in welchem Umfang Uridin in G_0 -arretierten isolierten Hepatozyten phosphoryliert und in Nukleinsäuren inkorporiert wird.

16.1. Die Inkorporation von ^3H -Uridin in zelluläre Nukleinsäuren

Die Bestimmung des ^3H -Uridineinbaus in hepatozelluläre Nukleinsäuren erfolgte durch zeit- und konzentrationsabhängige

Messungen der an die säureunlösliche Fraktion der Leberzellen gebundenen Radioaktivität nach Hydrolyse (Abb. 22).

Im untersuchten Konzentrationsbereich von ^3H -Uridin bis $0,86 \mu\text{mol/l}$ war keine Sättigung zu erkennen und bei allen Konzentrationen zeigte sich über einen Versuchszeitraum von 60 min eine lineare Zunahme des Uridineinbaus in Nukleinsäuren (Abb. 22).

Aufgrund des umfangsmäßig sehr geringen Einbaus von ^3H -Uridin lassen sich jedoch sichere Aussagen erst bei der höchsten untersuchten Konzentration treffen.

Setzt man die innerhalb von 15 min. eingebauten Uridinmengen in Beziehung zu der im gleichen Zeitraum bei $0,6 \mu\text{mol/l}$ aufgenommene Gesamtmenge an säurelöslichen ^3H -Uridinbestandteilen (Abb 16), so ergibt sich, daß bei den beiden niedrigen Konzentrationen ($0,06$ und $0,51 \mu\text{mol/l}$) nur ein Anteil zwischen 1,8 (bei $0,51 \mu\text{mol/l}$) und 4,4 % (bei $0,86 \mu\text{mol/l}$) der intrazellulären Radioaktivität an Nukleinsäuren gebunden war. Da es sich nicht um regenerierende und damit teilungsaktive Leberzellen handelt, kann angenommen werden, daß der überwiegende Anteil der Radioaktivität an die RNA-Fraktion gebunden ist.

Tabelle 5: ^3H -Uridininkorporation in hepatozelluläre Nukleinsäuren

Konzentration ^3H -Uridin im Inku- bationsmedium [$\mu\text{mol/l}$]	^3H -Uridin im Nuk- leinsäureanteil von Hepatozyten [$\text{pmol}/10^6$ Zellen]
0,06	$0,085 \pm 0,142$
0,51	$0,160 \pm 0,095$
0,86	$0,395 \pm 0,091$

Die Werte sind Mittelwerte aus 3 Versuchen $\pm$ Standardabweichung. Inkubationszeit 15 min.

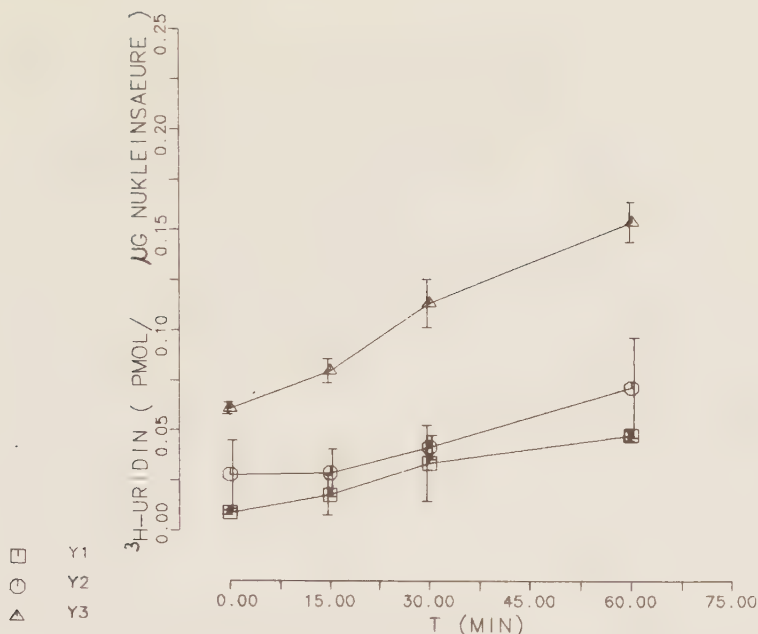


Abbildung 22: Inkorporation von ^3H -Uridin in Nukleinsäuren von Hepatozyten

Die Zellen wurden mit 3 unterschiedlichen Konzentrationen von ^3H -Uridin (Y1, Y2, Y3) inkubiert. Die Radioaktivitätsbestimmung erfolgte aus dem nicht säurelöslichen Anteil des Zellinhalts. Die Werte sind Mittelwerte aus 3 Versuchen $\pm$ Standardabweichung.

Y1 = 0,06 μmol ^3H -Uridin/l Inkubationsmedium

Y2 = 0,51 μmol ^3H -Uridin/l Inkubationsmedium

Y3 = 0,86 μmol ^3H -Uridin/l Inkubationsmedium

Da der Einbau von Uridin in die Nukleinsäuren in einem Untersuchungszeitraum von 60 min. bei der Konzentration von 0,51 μmol ^3H -Uridin/l, welche der in den zeitabhängigen Transportversuchen verwendeten Konzentrationen von 0,6 $\mu\text{mol/l}$ am nächsten kommt, quantitativ vernachlässigbar war, wurde bei den nachfolgenden Experimenten die Inkorporation von ^3H -Uridin in Nukleinsäuren nicht mehr berücksichtigt.

16.2. Uridinmetabolismus bei nicht geschädigten Hepatozyten

Die Auftrennung des Gemisches von Uridin und seinen Folgeprodukten, welche in den säurelöslichen Lyophilisaten des Zellinhalts vorhanden waren, erfolgte mittels Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC).

Tab. 6 zeigt die Trennleistung der gewählten Methode anhand der Retentionszeiten von Pyrimidinnukleosiden und entsprechender Nukleotide bis hin zu Triphosphaten. Die Werte in Tab. 6 wurden mit unmarkierten Reinsubstanzen und photometrischer Detektion bei 260 nm ermittelt. Nähere Angaben zur Methode siehe unter 8.6.

Tabelle 6: Retentionszeiten von Pyrimidinderivaten

Substanz	Substanzgruppe	Retentionszeit [min]	Fraktionsnummer
Uridin	Nukleoside	2,29	2
Cytidin		2,28	2
Thymidin		2,10	2
UMP	Monophosphate	32,21	17
CMP		32,30	17
TMP		32,53	17
UDP	Diphosphate	63,29	32
CDP		63,90	32
TDP		63,51	32
UTP	Triphosphate	90,58	46
CTP		90,57	46
TTP		90,31	46

Nähere Angaben zur Methode unter 8.7.

Aufgrund der großen Retentionszeitunterschiede war eine Auftrennung des radioaktiv markierten Eluats bei der gewählten Fraktionssammeldauer von jeweils 2 min. in Nukleoside sowie Mono-, Di- und Triphosphate möglich. Die geringen Reten-

tionszeitunterschiede der Derivate verschiedener Nukleobasen innerhalb der einzelnen Gruppen erlaubten aus technischen Gründen keine Auftrennung nach einzelnen Pyrimidinen. Daher blieben mögliche Umwandlungen von ^3H -markierten Uridinnukleotiden in andere Pyrimidinnukleotide unberücksichtigt.

In den folgenden Versuchen wurde mit einem Versuchsansatz wie er für die Bestimmung des Auswärtstransports zur Anwendung kam (siehe 8.6.), die Verteilung der Radioaktivität über die verschiedenen Fraktionen nach Beladung der Zellen durch 20-minütige Vorinkubation mit ^3H -Uridin und anschließender Entfernung des markierten Nukleosids aus dem Außenmedium (Zeitpunkt 0 min.) ermittelt. Die Messungen erfolgten getrennt im Intrazellulärraum und im Außenmedium, so daß durch diesen Versuchsansatz folgende Parameter erfaßt werden konnten:

- 1) Uridingesamtaufnahme über 20 min.
- 2) Metabolisierung des Nukleosids in seine entsprechenden Nukleotide
- 3) Freisetzung von Uridin und seinen Metaboliten in das Außenmedium.

Die Auswertung der Verteilung der Radioaktivität über die einzelnen Fraktionen ergab die Werte aus Tab. 7.

Bei der Bestimmung des Phosphorylierungsmusters ergaben sich relativ große Streuungen für die einzelnen Nukleotide, die bei der geringen Konzentration v.a. im Außenmedium so umfangreich waren, daß eine gesicherte Quantifizierung nicht mehr durchgeführt werden konnte. Es wurde deshalb im folgenden nur mehr die Gesamtsumme der Uridinphosphate (ΣP) im Außenmedium und (mit Ausnahme der Kontrollen) auch im Intrazellulärraum ermittelt und dargestellt.

Tabelle 7: Aufnahme, Metabolisierung und Freisetzung von ^3H -Uridin in carbogenbegasteten Hepatozyten (Kontrollzellen)

Zeit (min.)	intrazellulär			extrazellulär	
	0	60		0	60
U + Σ P ($\mu\text{mol}/10^6$ Zellen)	9,39 $\pm$ 0,72	1,54 $\pm$ 0,230			
($\mu\text{mol}/\text{ml}$)	2342,33 $\pm$ 355,818	489,16 $\pm$ 73,415			
Σ P ($\mu\text{mol}/\text{ml}$)	266,37 $\pm$ 26,808	648,80 $\pm$ 199,66		5,86 $\pm$ 1,794	7,40 $\pm$ 2,167
in/out-Quotient	561,30 $\pm$ 250,312	66,31 $\pm$ 27,537			
U	78,11 $\pm$ 7,176	44,43 $\pm$ 12,280		52,97 $\pm$ 2,583	41,68 $\pm$ 27,286
UMP	1,09 $\pm$ 0,651	30,54 $\pm$ 8,858			
UDP	20,69 $\pm$ 7,323	11,48 $\pm$ 4,048			
UTP	0,67 $\pm$ 0,122	13,57 $\pm$ 3,369			
Σ P	21,89 $\pm$ 7,173	55,59 $\pm$ 12,284		48,20 $\pm$ 3,071	59,33 $\pm$ 0,890
U -- Σ P	3,95 $\pm$ 1,751	0,856 $\pm$ 0,392		0,702 $\pm$ 0,309	1,10 $\pm$ 0,125
(%/%)					

Die lyophilisierten Proben wurden in je 100 μl aqua bident. resuspendiert. Von dieser Lösung wurden 20 μl auf die HPLC-Säule aufgebracht.

U = Uridin

MP = Monophosphat, DP = Diphosphat, TP = Triphosphat

Σ P = Gesamtmenge aller Uridinnukleotide.

Das Phosphorylierungsmuster ist als % der Gesamtaktivität angegeben.

Der "in/out-Quotient" stellt das Verhältnis zwischen intrazellulärer und extrazellulärer Konzentration von Uridin und seinen Metaboliten dar (jeweils als $\mu\text{mol}/\text{ml}$ intrazellulärem Wasserraum) - bzw. $[\text{ml Inkubationsmedium}]$ unter Zugrundelegung eines Intrazellulärtraumes von $[3,14 \mu\text{l}/10^6 \text{ Zellen}]$.

Die Werte sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung aus 3 Versuchen.

Die Reaktion läuft über die Bildung von Monophosphaten hin zu einer relativen "Anhäufung" von Diphosphaten. Zu einem großen Teil sind die relativ niedrigen Anteile an intrazellulärem UMP und UTP auf eine Weiterreaktion von UMP zu UDP und auf einen Einbau von UTP in Nukleinsäuren zurückzuführen.

UDP kommt offensichtlich die Rolle eines "Nukleotidpools" in ruhenden Hepatozyten zu.

Im weiteren Verlauf gleichen sich die Unterschiede jedoch weitgehend aus, wobei jedoch insgesamt der prozentuale Anteil der Nukleotidfraktion stark ansteigt, woraus ein deutlicher Abfall des Quotienten von Nukleosid-/Nukleotidanteil ($U/\Sigma P$) resultiert. Dieser Anstieg ist einerseits bedingt durch eine 2,4-fache Zubildung von phosphorylierten Uridinderivaten in der metabolisch intakten Zelle, sowie durch die Tatsache, daß bei intakter Membran die phosphorylierten Produkte im Gegensatz zum Nukleosid die Zelle nicht mehr verlassen können.

Aus der aktiven Aufnahme mit nachfolgender Phosphorylierung resultiert der hohe in/out-Quotient von 561,3 bei 0 min, der dann vorwiegend infolge des Countertransports von Uridin auf Werte um 60 abfällt. Die Verschiebung des $U/\Sigma P$ -Verhältnisses im Außenmedium korreliert mit entsprechend gegensinniger Verschiebung des intrazellulären Quotienten und deutet darauf hin, daß mehr Uridin als Nukleotide freigesetzt wurden.

Aus den Ergebnissen in Tab. 7 und Abb. 23 ergibt sich somit, daß auch unter Berücksichtigung der großen Schwankungsbreite bei der Messung phosphorylierter Uridinnukleotide Hepatozyten unter den gegebenen Kontrollbedingungen hinsichtlich Membranfunktion und metabolischer Kapazität in der Lage sind, Uridin intrazellulär anzureichern, zu phosphorylierten Produkten weiter zu metabolisieren und phosphorylierte Produkte vermehrt intrazellulär zurückzuhalten.

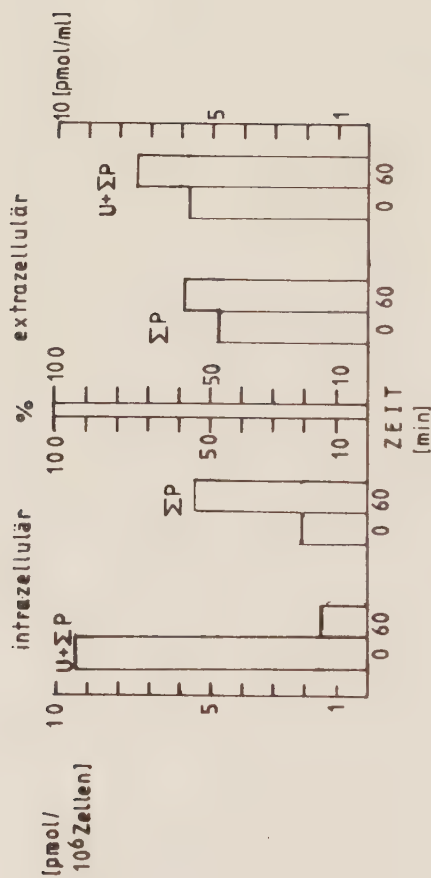


Abb. 23: Uridinaufnahme, -freisetzung und -phosphorylierung bei Kontrollhepatozyten

Die Werte sind Mittelwerte aus 3 Versuchen.

Die intrazelluläre Gesamtaufnahme (U + ΣP) ist in (pmol/10⁶ Zellen) angegeben. Die extrazelluläre Gesamtaktivität ist in (pmol/ml) Inkubationsmedium angegeben.

Die Summe aller Nukleotide (ΣP) ist als % der Gesamtaktivität angegeben.

17. Uridinaufnahme und -metabolismus bei geschädigten Hepatozyten

17.1. Der Uridintransport bei Hepatozytenschädigung durch N₂-Begasung

In den unter 11. dargestellten Versuchen ergaben sich bei N₂-Begasung von Hepatozyten aus den Veränderungen des intrazellulären Kaliumgehalts, der Trypanblauanfärbbarkeit sowie des Laktat-Pyruvat-Quotienten übereinstimmende Hinweise auf eine stark erhöhte Beeinträchtigung der Zellvitalität.

Parallel zu den Untersuchungen über den Uridinstoffwechsel wurde bei den hier beschriebenen Versuchen erneut eine Überprüfung der Vitalität vorgenommen. Die Werte unterscheiden sich erheblich von der Kontrolle unter Carbogenbegasung, und die Zellschädigung zeigte sich deutlich ab der 1. Probenentnahme (t₀), nach vorhergehender 15-minütiger N₂-Begasung und bestätigten die Ergebnisse unter 11 (Tab. 8).

Tabelle 8: Vitalitätskriterien isolierter Hepatozyten bei N₂-Begasung

Versuchsbedingung	Zeit min	Trypanblauanfärbbarkeit %	intrazellulärer K ⁺ -Gehalt [mmol/l]	Laktat-Pyruvat-Quotient
Kontrolle 120 rpm im Rundschüttler	0	10 ± 1,0	125 ± 13	5,4 ± 1,6
	30	12 ± 2,6	118 ± 20	6 ± 4,6
	60	11 ± 2,2	118 ± 10	6,8 ± 2,4
N ₂ -Begasung	0	50 ± 13,2	91 ± 14,0	44 ± 13,3
	30	42 ± 12,3	70 ± 15,0	46 ± 13
	60	90 ± 16,0	29 ± 18,0	99 ± 17,5

Die Werte sind Mittelwerte aus n = 3 Versuchen ± Standardabweichung.

Auf den Uridintransport und die Uridinmetabolisierung könnte sich die N_2 -Begasung dahingehend auswirken, daß

- die starke Beeinträchtigung der Membranintegrität (hohe Trypanblaufärbbarkeit) zu einem vermehrten Ausstrom von 3H -Uridin-Metaboliten in das Außenmedium führt und
- (entsprechend der Verringerung des intrazellulären K^+ -Gehalts) integrale Membranprozesse wie die Uridinaufnahme in die Zelle behindert sowie
- durch die Störung des Energiestoffwechsels (hoher Laktat-Pyruvat-Quotient) in eine verminderte Metabolisierung von 3H -Uridin bei einer anaeroben Stoffwechsellage mündet.

Wie aus Tab. 9 hervorgeht, dominieren zu Versuchsbeginn entsprechend der zu erwartenden vorrangigen Beeinträchtigung des Zellmetabolismus durch die O_2 -Verarmung Veränderungen der Uridinphosphorylierungsrate, die weniger als 50 % der entsprechenden Kontrollwerte beträgt. Die gestörte Phosphorylierung kommt auch zum Ausdruck in dem hohen prozentualen Uridinanteil und einem daraus resultierendem $U/\Sigma P$ -Quotienten, der über 3-fach höher liegt als der betreffende Wert in Kontrollzellen.

Im Vergleich zu den Änderungen an der Uridinphosphorylierung war die Abnahme der Gesamtaufnahme ($U/\Sigma P$) nur gering ausgeprägt. Die Zellen besaßen initial noch eine ausreichende Membranintegrität, um Uridin aufzunehmen und intrazellulär anzureichern (in/out). Intrazellulär stand somit ausreichend Substrat zur Phosphorylierung zur Verfügung, so daß die reduzierte Phosphorylierung nicht auf eine verringerte Aufnahme zurückgeführt werden kann.

Die im Vergleich zur Kontrolle niedrigeren Werte der Gesamtaufnahme ($U + \Sigma P$) und intrazellulären Anreicherung (in/out) sind zum großen Teil durch die geringere Bildung von Uridinnukleotiden bedingt.

Im Verlauf des Versuchs fallen die Werte $U + \Sigma P$ und in/out jedoch stärker als die Kontrollen ab, ein Hinweis darauf, daß sich unter Hypoxie zeitabhängig ein stärker ausgeprägter Membranschaden einstellt.

Der überproportionale Anstieg des prozentualen Anteils von ΣP im Intrazellularraum ist möglicherweise bedingt durch einen zuerst eintretenden Auswärtsstrom des leichter membrangängigen Uridins, wodurch sich trotz geringer Phosphorylierung der relative Nukleotidanteil erhöht. Die Veränderungen der prozentualen Verhältnisse von U und ΣP im Außenmedium und der starke Anstieg des Quotienten $U/\Sigma P$ bei gleichzeitigem Abfall des Wertes in den Zellen bestätigen diese Annahme.

Tabelle 9: Aufnahme, Metabolisierung und Freisetzung von ³Uridin in Hepatozyten unter N₂-Begasung

Zeit	intrazellulär		extrazellulär	
	0	60	0	60
U + Σ P [μ mol/10 ⁶ Zellen] [μ mol/ml] P [pmol/ml]	7,05 $\pm$ 0,256 2245 $\pm$ 81,569 130,07 $\pm$ 46,455	0,32 $\pm$ 0,058 103,15 $\pm$ 18,771 78,87 $\pm$ 17,879	9,22 $\pm$ 0,306	n.b.
in/out-Quotient	241,35 $\pm$ 2,402	11,16 $\pm$ 1,851		
U Σ P %	93,01 $\pm$ 0,205 6,98 $\pm$ 0,144	24,02 $\pm$ 3,855 76,02 $\pm$ 3,889	72,23 $\pm$ 6,121 28,34 $\pm$ 6,205	98,83 $\pm$ 0,093 1,17 $\pm$ 0,092
U Σ P (%/%)	13,31 $\pm$ 0,296	0,31 $\pm$ 0,067	3,43 $\pm$ 0,589	84,53 $\pm$ 6,732

Σ P = Gesamtmenge der Uridinnukleotide. U und Σ P sind als % der Gesamtradioaktivität angegeben.

in/out-Quotient: Siehe Erläuterung zu Tab. 7.

n.b.: Wert wurde nicht gemessen.

Werte sind Mittelwerte aus 3 Versuchen $\pm$ Standardabweichung.

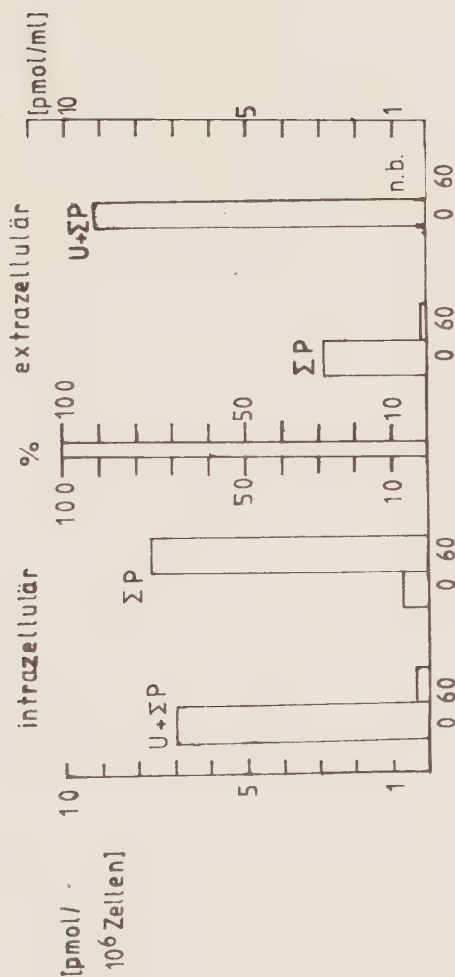


Abb. 24: Uridinaufnahme, -freisetzung und -phosphorylierung bei N_2 -begasten Hepatozyten.

Die Werte sind Mittelwerte aus 3 Versuchen.

Die intrazelluläre Gesamtaufnahme ($U + \Sigma P$) ist in $[\text{pmol}/10^6 \text{ Zellen}]$ angegeben. Die extrazelluläre Gesamtaktivität ist in $[\text{pmol}/\text{ml} \text{ Inkubationsmedium}]$ angegeben.
Die Summe aller Nukleotide (ΣP) ist als % der Gesamtaktivität angegeben.
n.b.: nicht bestimmt

17.2. Der Uridintransport bei mechanischer Schädigung der Hepatozyten

Bei mechanischer Schädigung durch verstärkte Schüttelbewegungen im Wasserbad entsprechend den Angaben unter 9.1.2. ergab sich bei der durchgeführten Überprüfung der Vitalität eine vergleichbare, teilweise noch stärker ausgeprägte Erhöhung der Trypanblauanfärbbarkeit bzw. Verringerung des intrazellulären Kaliumspiegels als bei den unter 10. beschriebenen Versuchen.

Auch hier wich der Laktat-Pyruvat-Quotient-Index nicht vom Normbereich (< 10) ab, so daß im Vordergrund dieses Schädigungsmodells eine Schädigung der Plasmamembran ohne umfangreiche Beeinträchtigung des Zellmetabolismus steht (Tab. 10).

Tabelle 10: Vitalitätskriterien bei mechanischer Schädigung isolierter Hepatozyten

Versuchsbedingungen	Zeit min	Trypanblau- anfärbbar- keit %	intrazellu- lärer K ⁺ - Gehalt [mmol/l]	Laktat-Py- ruvat-Quo- tient
Kontrolle				
120 rpm im Rund- schüttelwasser- bad	0 30 60	10 ± 1 12 ± 2,6 11 ± 2,2	125 ± 13 118 ± 20 118 ± 10	5,4 ± 1,3 6 ± 4,3 6,8 ± 2,5
mechanische Schädigung bei 240 Schüttelbe- wegungen min. im Reziprok-Schüt- telwasserbad	0 30 60	20 ± 8 32 ± 13 39 ± 11	103 ± 14 98 ± 20 85 ± 13	10 ± 1,5 7 ± 2,6 7 ± 2,2

Die Werte sind Mittelwerte aus n = 3 Versuchen ± Standardabweichung.

Wie nach der Art der Schädigung zu erwarten war, zeigten die Membranparameter Aufnahme und Freisetzung von radioaktivem Uridin(-derivaten) sowie die intrazelluläre Anreicherung (in/out-Quotient) deutliche Abweichungen von den Werten der Kontrolle.

Die Gesamtaufnahme ($U + \Sigma P$) lag von Anfang an deutlich unterhalb der Kontrollwerte. Im weiteren Verlauf verringerte sich die intrazelluläre Konzentration nur mehr geringfügig (Tab. 7 und 11, Abb. 25).

Dieser Befund deutet darauf hin, daß bereits zu Beginn des Auswärtstransports kein wesentliches Konzentrationsgefälle zwischen Intra- und Extrazellulärraum mehr bestand. Einen weiteren Anhaltspunkt hierfür liefert auch der in/out-Quotient, der weniger als 4 % des entsprechenden Wertes von Kontrollzellen betrug (Tab. 7 und 11).

Die Ergebnisse liefern deutliche Hinweise darauf, daß die Plasmamembran ihre Funktion als Permeationsbarriere verloren hat und die Zelle nicht mehr in der Lage ist, aufgenommene und an 3H -Uridin gebundene Radioaktivität intrazellulär zurückzuhalten.

Als Ursache hierfür kommt nicht eine gestörte Uridinphosphorylierung und eine dadurch verringerte Bildung an impermeablen Nukleotiden mit der zwangsläufigen Folge einer Anhäufung des membrangängigen Nukleosids in Frage. Diese Annahme läßt sich aus dem hohen Anteil der Nukleotide (ΣP) an der Gesamtfraktion sowie von dem von Anfang an niedrigen $U/\Sigma P$ -Wert ableiten (Tab. 11). Die Abnahme dieses Quotienten im Außenmedium hängt möglicherweise damit zusammen, daß sich der Membranschaden kontinuierlich entwickelt, wobei zuerst der empfindlichere Membrantransport von Uridin beeinträchtigt wird (niedriges $U + \Sigma P$), während mit zunehmender Schädigung die Permeabilität für Nukleotide an Bedeutung gewinnt (Zunahme von ΣP im Außenmedium). Der in/out-Quotient läßt hingegen eine solche Differenzierung nicht zu, da er nur die Summe beider Prozesse reflektiert.

Tabelle 11: Aufnahme, Freisetzung und Metabolisierung von ^3H -Uridin bei mechanisch geschädigten Hepatozyten

Zeit	intrazellulär		extrazellulär	
	0	60	0	60
U + Σ P (pmol/10 ⁶ Zellen) (pmol/ml) P (pmol/ml)	1,147 $\pm$ 0,248 365,488 $\pm$ 79,032 297,49 $\pm$ 6,78	1,087 $\pm$ 0,317 346,349 $\pm$ 101,226 280,67 $\pm$ 110,015	17,397 $\pm$ 0,815	31,310 $\pm$ 8,765
in/out-Quotient	20,463 $\pm$ 4,464	12,243 $\pm$ 6,357		
U — Σ P — %	19,103 $\pm$ 2,288 80,907 $\pm$ 2,280	20,858 $\pm$ 9,751 79,167 $\pm$ 9,738	76,101 $\pm$ 7,856 23,956 $\pm$ 7,605	12,327 $\pm$ 4,902 87,820 $\pm$ 4,951
U — Σ P — (%/%)	0,237 $\pm$ 0,035	0,276 $\pm$ 0,165	3,17 $\pm$ 2,297	0,142 $\pm$ 0,065

Nähere Erläuterungen siehe Tab. 7.

Werte sind Mittelwerte aus 3 Versuchen $\pm$ Standardabweichung.

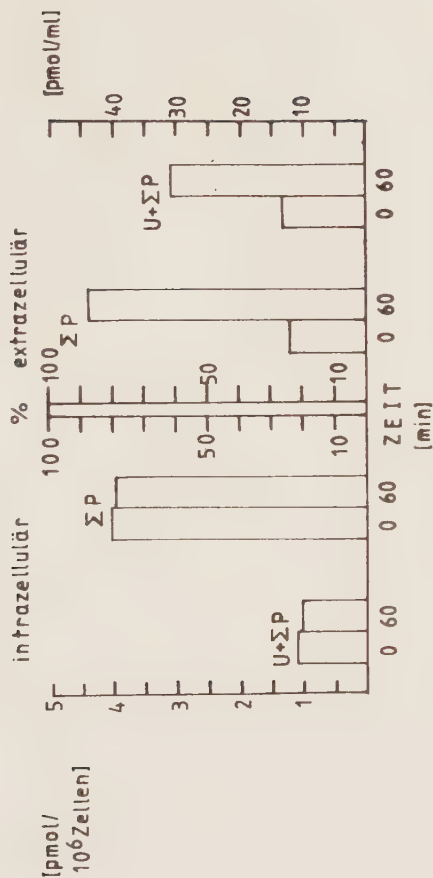


Abb. 25: Uridinaufnahme, -freisetzung und -phosphorylierung bei mechanisch geschädigten Hepatozyten.

Die Werte sind Mittelwerte aus 3 Versuchen.

Die intrazelluläre Gesamtaufnahme ($U + \Sigma P$) ist in $[\text{pmol}/10^6 \text{ Zellen}]$ angegeben. Die extrazelluläre Gesamaktivität ist in $[\text{pmol}/\text{ml}]$ Inkubationsmedium angegeben. Die Summe aller Nukleotide (ΣP) ist als % der Gesamaktivität angegeben.

17.3. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse zur Vitalitätsbeeinflussung bei verschiedenen Schädigungsmodellen

In den folgenden Abbildungen sind vergleichend die Veränderungen der verschiedenen untersuchten Vitalitätsparameter bei Kontrollzellen sowie bei anoxischen und mechanisch geschädigten Zellen dargestellt.

Die Werte entsprechen den in den Abschnitten 15., 16., und 17 dargestellten Ergebnissen.

Legende zu Abb. 26, 27, 28, 29



Kontrolle



mechanisch
geschädigte
Hepatozyten



anoxische
Hepatozyten

U = freies Uridin

ΣP = Summe des %-Anteils aller phosphorylierten Uridinnukleotide an der Gesamtradioaktivität

$U/\Sigma P$ = Quotient des %-Anteils von Uridin (U) und seinen Nukleotiden (P)

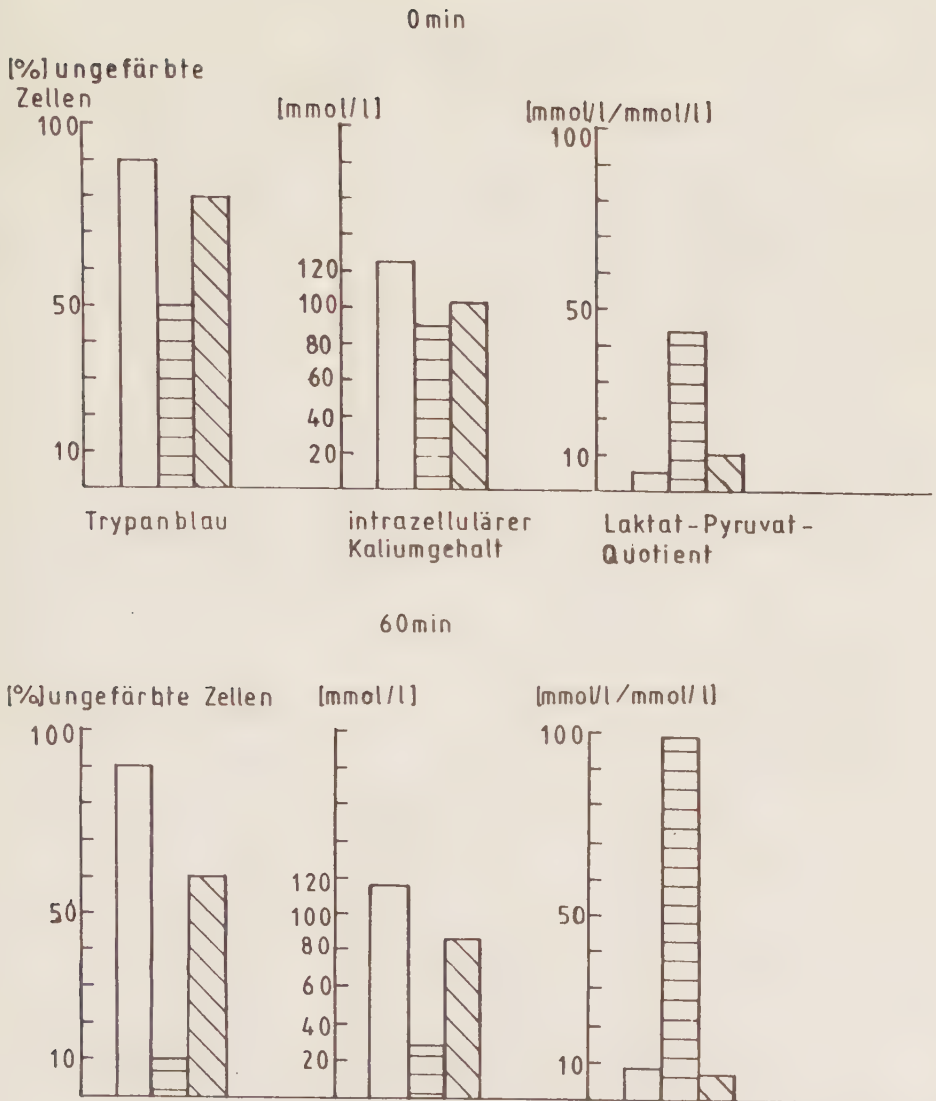


Abb. 26: Herkömmliche Vitalitätsparameter isolierter Hepatozyten bei verschiedenen Schädigungsmodellen
Legende siehe Seite 72

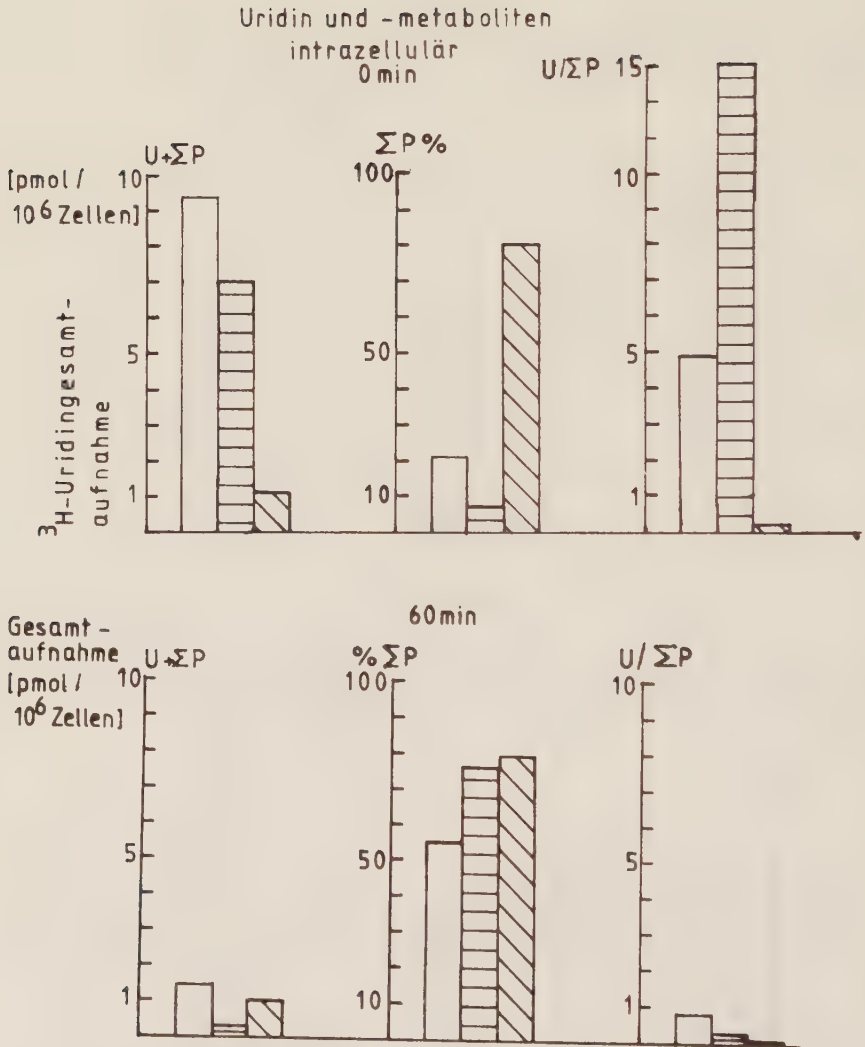


Abb. 27: Intrazelluläre Anteile von ³H-Uridin und seinen Metaboliten bei verschiedenen Schädigungsmodellen

Legende siehe Seite 72

Uridin und -metaboliten
extrazellulär
0 min

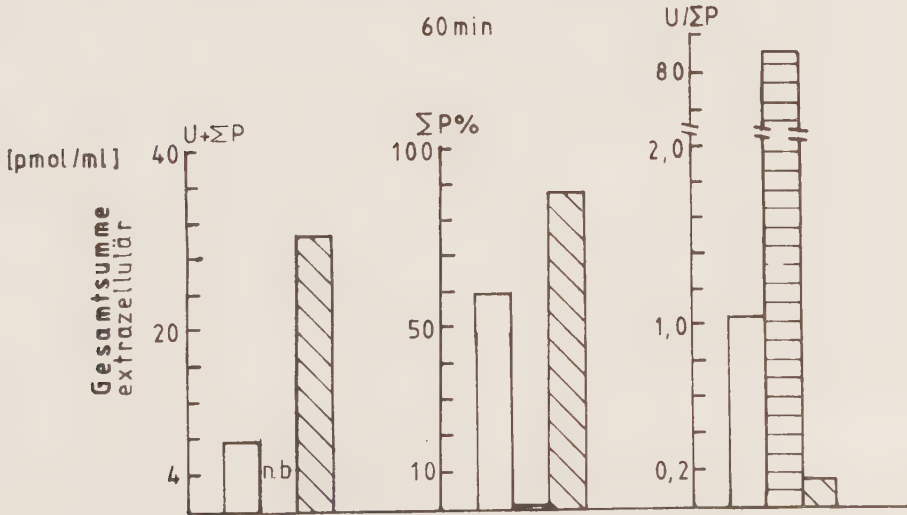
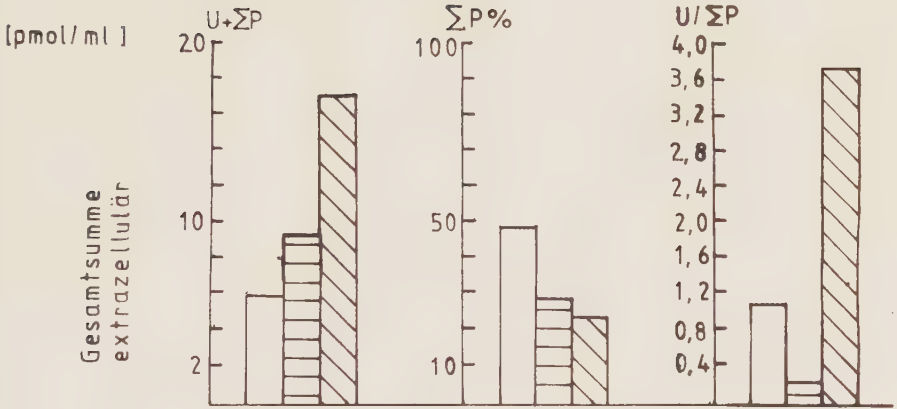


Abb. 28: Extrazelluläre Anteile von Uridin und seinen Nukleotiden bei verschiedenen Schädigungsmodellen
Legende siehe Seite 72
n.b. = Wert wurde nicht bestimmt

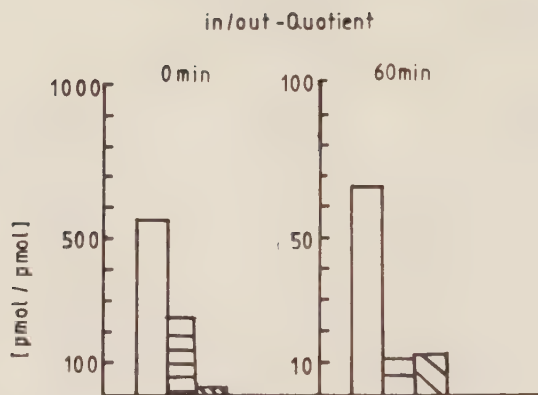


Abb. 29: In/out-Quotient von ^3H -Uridin und seinen Metaboliten bei verschiedenen Schädigungsmodellen
Legende siehe Seite 72

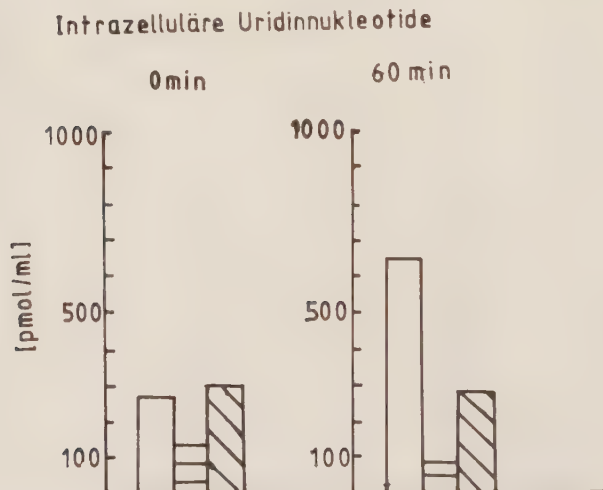


Abb. 30: Intrazelluläre Konzentration von ^3H -Uridinnukleotiden bei verschiedenen Schädigungsmodellen
Legende siehe Seite 72

18. Diskussion

Die Versuchsergebnisse bestätigen die in der wissenschaftlichen Literatur (66, 6) festgestellte begrenzte Aussagekraft "klassischer" Vitalitätsparameter. Dies traf insbesondere auf den Laktat-Pyruvat-Index zu, welcher selbst bei schwerwiegenden Beeinträchtigungen der Zellmembrankonfiguration und -funktion (Abb. 12) nicht erfaßte und somit ein unzutreffendes Bild der Hepatozytenvitalität abgibt.

Auch die in Bezug auf den Status der Zellmembran aussagefähigeren Kriterien Trypanblaufärbbarkeit und intrazellulärer Kaliumgehalt ließen keine umfassenden Aussagen hinsichtlich des Grades und der Art der Hepatozytenschädigung zu. Der intrazelluläre Kaliumgehalt ermöglicht zwar - im Gegensatz zum Trypanblautest - eine gleichzeitige Aussage über metabolische Schädigung und über Membranschädigung. Dies zeigte sich darin, daß die Kaliumkonzentration sowohl bei mechanischer Schädigung (Abb. 11) als primärem Membranschaden als auch bei Anoxie (Abb. 14) als primär metabolischer Schädigung abfiel. Eine Unterscheidung der Schädigungsarten ist jedoch nicht möglich. Dieser Aspekt gewinnt an Bedeutung sobald die Zelle auf ein niedrigeres metabolisches "Steady-State" eingestellt ist ohne irreversible Schädigung z.B. unter Luftbegasung (Abb. 14). Hier lagen die Kaliumwerte niedriger als bei der Kontrolle. Es war jedoch nicht möglich festzustellen, ob der Abfall des Kaliums lediglich einen reversiblen metabolischen Zustand der Zelle widerspiegelt oder auch einen irreversiblen Membranschaden.

Unabhängig vom Schädigungstyp korrelierten Trypanblau und Kalium qualitativ und quantitativ. Dies läßt den Schluß zu, daß sie sich hinsichtlich ihrer Aussagefähigkeit nicht wesentlich unterscheiden.

Somit erhebt sich die Forderung nach einem Parameter, der gleichzeitig und unterscheidbar metabolische Veränderungen und Membranstörungen erfaßt.

Die vorliegenden Untersuchungen lassen den Schluß zu, daß die gleichzeitige Erfassung von ^3H -Uridintransport und -metabolismus diese Anforderungen erfüllt.

Wie die Versuchsergebnisse zeigen, handelt es sich bei der Uridinaufnahme in Hepatozyten im Konzentrationsbereich bis ca. 20 $\mu\text{mol/l}$ um einen sättigbaren Transportprozess (Tab. 4). Bei solchen Transportprozessen kann allgemein angenommen werden, daß sie durch Carrier vermittelt werden, die in die Plasmamembran integriert sind. Somit kann der Uridintransport als ein integraler Membranparameter betrachtet werden.

Als charakteristisches Kriterium Carrier-vermittelter Transportprozesse wurde ein Uridincountertransport nachgewiesen (Abb. 21), dessen Gleichgewichtseinstellung auf dem hohen Niveau der intrazellulären Radioaktivität erfolgte.

Nur ca. 40 % der intrazellulären Radioaktivität nahm am Auswärtstransport teil. Da bei der gewählten ^3H -Uridinkonzentration von 0,6 $\mu\text{mol/l}$ nur mit einer sehr geringen Bindung der Radioaktivität an Nukleinsäuren in der Größenordnung von 1 % der intrazellulären Gesamtradioaktivität zu rechnen ist (Abb. 21), kann angenommen werden, daß die restlichen in der Zelle verbleibenden ca. 60 % als Nukleotide vorliegen.

Aufgrund des hohen Überschusses an "kaltem" (unmarkiertem) Substrat im Außenmedium ist zu folgern, daß praktisch der gesamte intrazelluläre Anteil von unverändertem ^3H -Uridin ausgetauscht worden ist. Somit ist die Plasmamembran der verwendeten Hepatozyten impermeabel für phosphorylierte Uridinmetaboliten, die im Vergleich zu Trypanblau (MG 961) bzw. zu intrazellulären Enzymen ein wesentlich geringeres Molekulargewicht aufweisen. Die intrazelluläre Rückhaltung dieser relativ kleinen Moleküle, die nur auf der Basis der Ladungsverhältnisse erfolgt, legt den Schluß nahe, daß mit der Messung der Auswärtsdiffusion von Nukleotiden Permeabilitätsveränderungen an der Plasmamembran wesentlich sensiti-
ver erfaßt werden können als anhand der Trypanblaufärbung oder Freisetzung intrazellulärer Enzyme.

Aufgrund des effektiven "salvage pathways" für Nukleotide (s. S. 23) kann angenommen werden, daß katabole Vorgänge von untergeordneter Bedeutung sind. Diese Annahme steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen zum Uridinkatabolismus (31a) wonach die Uridinphosphorolyse bei Leberparenchymzellen nur in sehr geringem Umfang abläuft.

Somit zeigt sich, daß intakte Hepatozyten entsprechend ihrem metabolischen Zustand und ihrer Plasmamembranintegrität, Uridin metabolisieren und intrazellulär anreichern. Verschiebungen von Substrat an das Außenmedium sind abhängig von der Phosphorylierungsrate und der Membranintegrität.

Darin besteht ein wesentlicher Unterschied zur Thymidinaufnahme, die in ruhenden Hepatozyten nicht von Metabolismus gefolgt wird und somit ein vollständiges Gleichgewicht erreicht, weshalb sich dieser Parameter, wie bereits dargestellt, nur zur Erfassung von Veränderungen der Plasmamembranintegrität eignet. Die bisherigen Untersuchungen zum Uridintransport erlauben noch keine Aussage darüber, ob dieser Transportprozess eine zur Thymidinaufnahme vergleichbare Lipidabhängigkeit aufweist und ebenso sensitiv der Dynamik physikochemischer Veränderungen im Verlauf membranschädigender Vorgänge folgen kann (66). Auf alle Fälle besteht der Vorteil gegenüber der Thymidinaufnahme auch darin, daß durch die Möglichkeit der Messung des Auswärtstransports von gebildeten Nukleotiden neben dem Transportprozeß ein zusätzlicher Membranparameter zur Verfügung steht.

Bei der Uridinaufnahme kann nicht eindeutig ermittelt werden, ob es sich um einen aktiven Transportprozeß oder eine erleichterte Diffusion handelt, da durch den "Sog" der nachfolgenden Metabolisierung der Aufnahmeprozess langsam (entsprechend der Metabolisierungsrate) weiterläuft, so daß in dem untersuchten Zeitraum kein endgültiges Gleichgewicht erreicht wird (Abb. 16).

Da bei der Weitermetabolisierung von ^3H -Uridin nach den vorliegenden Untersuchungen der Einbau von Uridinnukleotiden in zelluläre Nukleinsäuren bei der Konzentration von $0,6 \text{ } \mu\text{mol/l}$

im Vergleich zur gesamten aufgenommenen Uridinmenge vernachlässigbar gering ist, kann angenommen werden, daß dadurch keine wesentliche Beeinflussung des Aufnahmeprozesses in ruhenden, in der G₀-Phase des Zellzyklus arretierten Hepatozyten resultiert.

Das Hauptaugenmerk bei der Metabolisierung von Uridin richtet sich somit auf die Phosphorylierung des Nukleosids.

Die Tatsache, daß ein wesentlicher Anteil des aufgenommenen Uridins bis zum Triphosphat phosphoryliert wird und diese Vorgänge während der gesamten Versuchsdauer fortlaufen, so daß am Versuchsende wesentlich mehr Nukleotide als zum Zeitpunkt der Entfernung von ³H-Uridin aus dem Inkubationsmedium intrazellulär vorhanden waren, zeigt, daß intakte Hepatozyten unter den gegebenen Bedingungen in der Lage waren, für die Reaktion der Uridinkinasen ausreichend energiereiche Phosphate zur Verfügung zu stellen. Die Messung der ³H-Uridinnukleotide läßt somit unter den gegebenen Bedingungen einen Rückschluß auf den metabolischen Zustand der Hepatozyten zu.

Allein die Tatsache, daß sich durch Uridin(counter)transport und Uridinphosphorylierung gleichzeitig Membran- und Stoffwechselalterationen erfassen lassen, begründet jedoch noch nicht eine Überlegenheit dieser Parameter gegenüber den bislang häufig verwendeten Vitalitätskriterien. Auch die Messung des intrazellulären Kaliumgehalt läßt Rückschlüsse sowohl auf die metabolische Situation der Hepatozyten als auch auf die Integrität der Zellmembran zu.

Wie die Versuchsergebnisse bei verschiedenen Schädigungsmodellen zeigen, läßt sich jedoch durch die Anwendung des Uridintransports und -metabolisierung zwischen metabolischer Störung und Membranschädigung unterscheiden, während eine derartige Differenzierung sich anhand von Verschiebungen des intrazellulären Kaliumgehalts nicht treffen läßt (Abb. 11 und 14).

Die Auswertung von Uridintransport und -metabolisierung hingegen ergab ein differenzierteres Bild mit charakteristischen Unterschieden bei den einzelnen Schädigungsmodellen.

So wirkte sich die Hypoxie durch N_2 -begasung primär auf die energieabhängige Uridinphosphorylierung aus, die um mehr als die Hälfte gegenüber Kontrollzellen verringert war (Tab. 4 und 9). Dies äußerte sich auch in einer Verschiebung des Reaktionsgleichgewichts zugunsten von Uridin ($U/\Sigma P$ in Tab. 9). Unter den gewählten Versuchsbedingungen zeigte sich aber weiterhin, daß zu Beginn die Plasmamembran noch so weit intakt war, daß 3H -Radioaktivität von Uridin intrazellulär angereichert wurde (Tab. 9).

Bei der mechanischen Schädigung hingegen war die Phosphorylierung nicht beeinträchtigt (ΣP und $U/\Sigma P$ in Tab. 11). Die Ergebnisse ergaben jedoch ohne eine primäre Störung des Zellstoffwechsels deutliche Hinweise auf eine fortschreitende Membranschädigung durch die mechanische Belastung: zunächst war die Uridinaufnahme in die Zellen beeinträchtigt entsprechend der verminderten Gesamtaufnahme $U + \Sigma P$ (Tab. 7 und 11) und der im Vergleich zu Kontrolle und hypoxischen Zellen niedrigen intrazellulären Anreicherung (in/out-Quotient, Abb. 29).

Im weiteren Verlauf traten Membrandiskontinuitäten auf, so daß dann vermehrt die noch ausreichend gebildeten Nukleotide in das Außenmedium gelangen konnten (Abb. 28).

Dieser Verlauf steht in Übereinstimmung zu den Ergebnissen aus anderen Untersuchungen über die Entwicklung von Membranschädigungen (23), wonach zunächst noch reversible physikochemische Alterationen (hier: Beeinträchtigung integraler Membranprozesse) in einen irreversiblen Verlust der Funktion als Permeationsbarriere (hier: Austritt von praktisch nicht membrangängigen Nukleotiden) einmünden.

Veränderungen von Uridinaufnahme, -metabolismus und -akkumulation erlauben demnach nicht nur ein detailliertes und sensitiveres Bild vom Zustand der Hepatozyten sondern auch eine deutliche Unterscheidung zwischen metabolischen und membran-

funktionellen Schädigungsbildern, im Gegensatz zu den übrigen hierzu parallel untersuchten "klassischen" Vitalitätskriterien Trypanblauanfärbbarkeit, intrazellulärer Kaliumgehalt und Laktat-Pyruvat-Quotient. Zwar reagierten auch diese bei beiden Formen der Hepatozytenschädigung (Abb. 26). Sie ließen jedoch entweder keine Rückschlüsse auf den primären Angriffspunkt einer Schädigung zu, wie der Kaliumgehalt, und/oder reagierten insensitiv auf progressive Zellzerstörung (Laktat-Pyruvat-Quotient) oder zeigten nur das Endstadium von Membranschädigungen auf wie der Trypanblautest. Die sog. Membranparameter Trypanblauindex und intrazellulärer K^+ -Gehalt zeigten auch zwischen hypoxischer und mechanischer Schädigung keine charakteristischen Unterschiede, mit denen auf den unterschiedlichen Angriffspunkt beider Noxen geschlossen werden könnte.

Im Gegensatz hierzu läßt sich durch Untersuchungen mit 3H -Uridin unter Messung der Parameter Gesamtaufnahme, intrazelluläre Anreicherung, Auswärtstransport und Phosphorylierungsrate einerseits bei mechanischer Schädigung eine Beeinflussung der Membranintegrität ohne wesentliche Störung metabolischer Vorgänge und andererseits der Phosphorylierung bei hypoxischer Schädigung eine Beeinträchtigung des Zellmetabolismus bei noch intakter Plasmamembran nachweisen und somit eine detaillierte Unterscheidung verschiedener Schädigungsbilder erreichen. Die Sensitivität dieser Differenzierung kommt auch im Zeitverlauf der hypoxischen Schädigung zum Ausdruck, bei der sich zusätzlich zur initial nur metabolischen Störung kontinuierlich ein Membranschaden entwickelt und in seiner Entstehung durch die verwendeten Parameter erfaßt werden kann (Tab. 9).

Uridinaufnahme und -metabolismus stellen somit aussagekräftige Vitalitätskriterien für isolierte Hepatozyten dar, mit denen sich sensitiv und unterscheidbar Veränderungen metabolischer Prozesse und der Plasmamembranintegrität darstellen lassen.

Diese Parameter erwiesen sich in ihrer Aussagekraft klassischen Vitalitätskriterien wie Trypanblauindex, intrazellulärer K^+ -gehalt und Laktat-Pyruvat-Quotient als deutlich überlegen.

Unter bestimmten Bedingungen, wenn eine selektive Beeinflussung des Uridinstoffwechsels vorliegt, ist jedoch die Anwendbarkeit der 3H -Uridinuntersuchungen limitiert. Dies könnte zutreffen bei regenerierenden Hepatozyten, da hierbei Uridin intrazellulär in nicht unerheblichem Umfang über eine Methylierung von UMP durch die Thymidylatsynthetase in Thymidinmonophosphat umgewandelt und in die DNA-Synthese eingeschleust wird.

Ferner können keine Aussagen bei Schädigungsbildern getroffen werden, die durch eine selektive Verarmung von energiereichen Uridinphosphaten entstehen z.B. bei der Galaktosamin-induzierten Leberschädigung (75). Eine derartige Begrenzung der Aussagekraft wäre auch bei Untersuchungen zum Fremdstoffmetabolismus an isolierten Hepatozyten im Hinblick auf Glukuronidierungsreaktionen möglich, bei denen UDP-Glukuronsäure verbraucht wird.

Hinsichtlich der Praktikabilität besitzt die Untersuchung der Uridinaufnahme und -metabolisierung ebenfalls Vorteile gegenüber "klassischen" Vitalitätskriterien.

Als versuchstechnischer Vorteil ist insbesondere von Bedeutung, daß weniger Zellen als bei den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten herkömmlichen Kriterien benötigt werden, und daß sich alle Daten aus einer einzigen Probe ermitteln lassen. Bei den verwendeten herkömmlichen Vitalitätskriterien muß zunächst die Trypanblaufärbung separat von der Messung des K^+ -Gehalts und Laktat-Pyruvat-Quotienten durchgeführt werden.

Allerdings erfordern die Untersuchungen der Uridinparameter einen hohen methodischen und zeitlichen Aufwand, der höher zu veranschlagen ist, als der Gesamtaufwand bei gemeinsamer

Bestimmung der herkömmlichen Vitalitätskriterien Trypanblauindex, intrazellulärer K^+ -gehalt und Laktat-Pyruvat-Quotient.

Somit bleibt nach wie vor für den raschen und einfachen Überblick über die Membranintegrität der Trypanblautest von Bedeutung. Wenn es jedoch auf Sensitivität und Genauigkeit bei der quantitativen und qualitativen Erfassung einer Hepatozytenschädigung auf der Ebene der Plasmamembran und des Zellstoffwechsels ankommt, ist die Messung der Uridinaufnahme, -akkumulation und -metabolisierung mit ihren vielfältigen Auswertungsmöglichkeiten den untersuchten herkömmlichen Vitalitätskriterien eindeutig überlegen.

19. Zusammenfassung

Bisher stand für isolierte Hepatozyten kein geeignetes Vitalitätskriterium zur gleichzeitigen Erfassung und Unterscheidung von Schäden auf der Ebene des Zellstoffwechsels und der Plasmamembran zur Verfügung.

Zur Prüfung der Verwendbarkeit von Uridinaufnahme und -metabolismus als Vitalitätskriterien wurde in isolierten Hepatozyten die Aufnahme, Phosphorylierung und intrazelluläre Anreicherung von ^3H -Uridin in Hepatozyten charakterisiert und unter verschiedenen Schädigungsbedingungen (Hypoxie, mechanische Schädigung) untersucht.

Das Verhalten dieser Parameter wurden mit den Veränderungen einiger bisher bekannter Vitalitätskriterien (Trypanblaufärbbarkeit, intrazellulärer K^+ -Gehalt, Laktat-Pyruvat-Quotient) verglichen.

Die Ergebnisse zeigen, daß nicht vorgeschädigte Kontrollzellen Uridin über membranständige Transportprozesse aufnehmen und im Anschluß daran in erheblichem Umfang phosphorylierten. Der Einbau von Uridinnukleotiden in Nukleinsäuren war sehr gering. Als Folge dieser Prozesse wurden Uridin und Nukleotide bei intakter Membran intrazellulär angereichert. Unter hypoxischen Bedingungen (N_2 -Begasung) kam es bereits initial zu einer Beeinträchtigung metabolischer Prozesse mit der Folge einer sehr geringen Phosphorylierung von Uridin. Erst wesentlich später wurde ein Membranschaden erkennbar anhand des im Vergleich zu Kontrollzellen stärker zunehmenden Auswärtstransports radioaktiven Substrats.

Bei initialer Membranschädigung durch mechanische Belastung der Hepatozyten wurde Uridin trotz weitgehend erhaltener Phosphorylierung intrazellulär nicht angereichert, da die geschädigte Plasmamembran die impermeablen Nukleotide nicht zurückhalten konnte.

Die genannten Veränderungen korrelierten mit einer Beeinträchtigung der klassischen Vitalitätskriterien Trypanblaufärbbarkeit, intrazellulärer Kaliumgehalt und Laktat/Pyruvat-Quotient unter gleichen Bedingungen. Diese herkömmlichen Parameter ermöglichten jedoch auch zusammengekommen keine so differenzierte Aussage über die möglichen Ursachen einer Zellschädigung wie die Untersuchung von Uridinaufnahme und -stoffwechsel.

20. Summary

Investigations on the reliability of ^3H -uridine uptake and metabolism as viability criteria in isolated hepatocytes.

At present there are no adequate viability criteria available for the simultaneous detection and differentiation of disorders of the plasma membrane and cell metabolism in isolated hepatocytes.

In order to test the suitability of uridine transport and metabolism for the assessment of hepatocellular viability, in isolated hepatocytes the uptake, phosphorylation, and intracellular accumulation of ^3H -uridine were investigated in normal and damaged (hypoxia or mechanical stress) cells. The behaviour of these parameters was compared to the alterations of the widely used viability criteria Trypan-blue-staining, intracellular K^+ -concentration, lactate-pyruvate ratio.

The results indicate that in undamaged cells uridine was taken up via a membrane-transport process followed by an extensive intracellular phosphorylation. Only a minute amount of uridine was incorporated into the nucleic acid fraction. Due to these processes uridine and its nucleotides were accumulated in cells with an intact plasma membrane.

Hypoxic conditions (N_2 -gassed hepatocytes) led to an early inhibition of metabolic processes as evidenced by the low rate of uridine phosphorylation.

An impairment of the plasma membrane functions could only be observed after a considerable time delay resulting in a markedly higher efflux of the radioactive substrate as compared to control hepatocytes.

After initial plasma membrane damage by mechanical stress, uridine was not accumulated intracellularly in spite of an almost unchanged phosphorylation since the injured plasma

membrane has apparently lost its ability to retain impermeable nucleotides.

The observed alterations correlated with the impairment of the classical viability criteria Trypan-blue-staining, intracellular K^+ , and lactate-pyruvate ratio under similar conditions. These conventional parameters, however, even in combination did not permit such a particular insight into the relevant causes of cell damage as it can be performed by the investigation of 3H -uridine uptake and metabolism.

21. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1. ALBANO, E., POLI, G., TOMASI, A. et al.: Toxicity of 1, 2-Dibromoethane in Isolated Hepatocytes: Role of Lipidoxidation. Chem.-Biol. Interactions 50, 255-265 (1984)
2. ALTSCUH, Ch.: Eine Ein-Schritt-Methode zur Trennung von Nukleosiden und ihren Mono-Di- und Triphosphaten mittels HPLC an Anionenaustauschern. Abstr. Comm. 1. Gesamtkongress der pharmazeutischen Wissenschaften, München (1983)
3. ANNUNDI, I., STAHL, A., and HÜGBERG, J.: Effects of Selenite on O_2 -Consumption, Glutathione Oxidation and NADPH Levels in Isolated Hepatocytes and the Role of Redox Changes in Selenite Toxicity. Chem.-Biol. Interactions, 50, 277-88 (1984)
4. ANWER, M.S. and HEGNER, D.: Effect of Na^+ on Bile Acid Uptake by Isolated Rat Hepatocytes. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 181-192 (1978)
5. BALLE, F., BOUMA, M.-E., WANG, S.-R. et al.: Isolation, Culture and Characterization of Adult Human Hepatocytes from Surgical Liver Biopsies. Hepatology 4, 849-854 (1984)
6. BAUR, H., KASPAREK, S. and PFAFF, E.: Criteria of Viability of Isolated Liver Cells. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 827-838 (1975)
7. BERGMAYER, H.U.:
p. in Bergmeyer H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Bd. II. 1407-1429, Verlag Chemie (1970)

8. BERRY, M.N. and FRIEND, D.S.: High Yield Preparation of Isolated Rat Liver Parenchymal Cells. J. Cell. Biol. 43, 506-520, (1969)
9. BIERI, F., BENTLY, P., WEACHTER, F. and STÄUBLI, W.: Use of Primary Cultures of Adult Rat Hepatocytes to Investigate Mechanisms of Action of Nafenopenin, a Hepatocarcinogenic Peroxisome Proliferator. Carcinogenesis 5, 1033-1039 (1984)
10. BOEHRINGER Testfibel, Klinik und Labor: Laktat, 3, Boehringer Mannheim GmbH (1979)
11. van den BOSCH, H., de WINTER, J.M. and AARSMAN, A.J.: Mechanisms in Phospholipase A₂ Activation. p. 77-83 in: Keppler, D., Popper, H., Bianchi, L. and Reutter, W. (Hrsg.): Mechanisms of Hepatocyte Injury and Death. Falk Symposium 38, MTP Press Limited, Lancaster (1984)
12. BRESCH, C., HAUSMANN, R.: p. 223 in: Bresch, C., Hausmann, R. (Hrsg.): Klassische und molekulare Genetik, Springer, Berlin (1972)
13. CADENAS, E. and SIES, H.: Free Radicals in Lipid Peroxidation and Prostaglandin Formation: Role of Glutathione. p. 167 in: Keppler, D., Popper, H., Bianchi, L., Reutter, W. (Hrsg.): Mechanisms of Hepatocyte Injury and Death. Falk Symposium 38, MTP Press Limited, Lancaster (1984)
14. LE CAM, A., GUILLOZO, A. and FREYCHET, P.: Ultrastructural and Biochemical Studies of Isolated Adult Rat

- Hepatocytes Prepared Under Hypoxic Conditions.
Exp. Cell Res. 98, 382-395 (1976)
15. LE CAM, A. and FREYCHET, P.: Neutral Amino Acid Transport. J. Biological Chem. 252, 148-156 (1977)
16. COHEN, S.S.: Commentary on the Therapeutic use of Nucleosides and the Penetrability of Phosphorylated Compounds. Biochem. Pharmacol. 24, 1929-1932 (1975)
17. COLBY, H.D., BROGAN, W.C., MILES, P.R.: Carbon Tetrachloride Changes in Adrenal Microsomal Mixed-function Oxidases and Lipid Peroxidation. Toxicol. appl. Pharmacol. 60, 492-499 (1981)
18. COOPER, T.G.: Proteinbestimmung mit der Biuret-Reaktion. p. 49-50 in: Cooper, T.G. (Hrsg.): Biochemische Arbeitsmethoden. Walter de Gruyter, Berlin (1981)
19. DAHNKE, H.-G. und MOSEBACH, K.-C.: In vivo-Untersuchungen zur Metabolisierung der Pyrimidinnukleoside. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1565-1574 (1975)
20. DAWSON, J.R., NORBECK, K., ANUNDI, I. and MOLDFUS, P.: The Effectiveness of N-acetylcysteine in Isolated Hepatocytes Against the Toxicity of Paracetamol, Acrolein and Paraquat. Arch. Toxicol. 55, 11-15 (1984)
21. DIANZANI, M.U. and GRAVELLA, E.: Inhibition of Protein Synthesis in Carbon tetrachloride induced Liver Injury. p. 225-238 in: Keppler, D. (Hrsg.): Pathogenesis and Mechanisms of Liver Cell Necrosis. MTP Press Limited, Lancaster (1975)

22. FARBER, J.L.: Membrane Injury and Calcium Homoeostasis in the Pathogenesis of Coagulative Necrosis.
p. 114-123 in: Keppler, D., Popper, H., Bianchi, L. and Reutter, W. (Hrsg.): Mechanisms of Hepatocyte Injury and Death. Falk Symposium 38. MTP Press Limited, Lancaster (1984)
23. FARBER, J.L. and El-MOFTY, S.R.: The Biochemical Pathology of Liver Cell Necrosis. Am J. Pathol. 81, 237-250 (1975)
24. FRIMMER, M. and KREH, W.: The Role of Oxidative and Glycolytic Metabolism in Cation Ion Transport of the Isolated Rat Liver Perfused with an Erythrocyte-free Medium. Naunyn-Schmiedenberg's Arch. Pharmakol. u. exp. Pathol. 268, 119-121 (1971)
25. GEE, D.L. and TAPPEL A.L.: Production of Volatile Hydrocarbons by Isolated Hepatocytes: an In vitro Model for Lipid Peroxidation Studies. Toxicol. appl. Pharmacol. 60, 112-120 (1980)
26. GOVINDAM, V.W., FAULSTICH, H. and WIELAND, TH.: In vitro Effects of Phalloidin on a Plasma Membrane Preparation from Rat Liver. Naturwissenschaften 11, 521-522 (1972)
27. GRINNA, L.S., BARBER, A.A.: Lipid Changes in the Microsomal and Mitochondrial Membranes of Rat Liver during Ageing. Fed. Proc. 38, 1425 (347) (1979)
28. GUSTAVSSON, B., MORLAND, J.: Comparison of Isolated Rat Hepatocytes Prepared From Liver Slices and Perfused Liver with Special Reference to Protein Metabolism. Analyt. Biochem. 108, 76-82 (1980)

29. HANKS, W.: Determination of Cell-Viability.
Proc. Soc. Exp. Biol. Rev. 98, 188-192 (1950)
30. HEGNER, L.: Investigations on the Effect of Phalloidin on Isolated Rat Liver Membranes. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 274, R 49 (1972)
31. HEGNER, D., LUTZ, F., ECKERMANN, V., GRIES, J., SCHNORR, B.: Effect of Phalloidin on Mg^{++} -ATPase (Na^{+} - K^{+})-ATPase and K^{+} -dependent p-Nitrophenylphosphatase Activity of Plasma Membranes isolated from Rat Liver. Biochem. Pharm. 19, 487-493 (1970)
- 31a. HOLSTEGE, A., LESER, H.-G., PAUSCH, J. und GEROK, W.: Uridine Catabolism in Kupffer Cells, Endothelial Cells, and Hepatocytes. Eur. J. Biochem. 149, 169-173 (1985)
32. HOWARD, R.B., CHRISTENSEN, A.K., GILLS, F. and PESCH, L.A.: The Enzymatic Preparation of Isolated Intact Parenchymal Cells from Rat Liver. J. Cell Biol. 35, 675-684 (1967)
33. HOWARD, R.B., PESCH, L.A.: Respiratory Activity of Intact Isolated Parenchymal Cells from Rat Liver. J. Biol. Chem. 243, 3105-3109 (1968)
34. INMON, J., STEAD, A., WATERS, M.D., LEWTAS, J.: Development of a Toxicity Test System Using Primary Rat Liver Cells. In Vitro 17, 1004-1010 (1981)
35. JAUREGI, H.O., HAYNER, H.T., DRISCOLL, J.L. et al.: Trypan blue Dye Uptake and LDH in Adult Rat Hepatocytes - Freshly Isolated Cells, Cell Suspensions, and Primary Monolayer Cultures. In Vitro 17 (12), 1100-1110 (1981)

36. JUNGERMANN, K. und MÖHLER, H.: Biochemie 472, 473, 478,
Springer, Berlin (1980)
37. KARLSON, P.: Nukleinsäuren und Proteinbiosynthese.
p. 103 in: Karlson, P. (Hrsg.): Kurzes Lehrbuch der
Biochemie. Georg Thieme Verlag, Stuttgart (1977)
38. KARLSON, P.: Coenzyme
p. 98 in: Karlson, P. (Hrsg.): Kurzes Lehrbuch der
Biochemie. Georg Thieme, Stuttgart (1977)
39. KRAFT, W., DÜRR, U.M.: Leberfunktion
p. 98-104 in: Kraft, W., Dürr, U.M. (Hrsg.): Kompen-
dium der Klinischen Laboratoriumsdiagnostik bei Hund,
Katze, Pferd. M. & H. Schaper, Hannover (1981)
40. KROKER, R.: Über die Eignung isolierter Leberzellen zur
Untersuchung hepatotoxischer Substanzen. Gießen,
Justus-Liebig-Universität, Diss. med. Vet. (1973)
41. KU, R.H., BILLINGS, R.B.: Relationships between Formal-
dehyde Metabolism and Toxicity and Glutathione Con-
centrations in Isolated Rat Hepatocytes. Chem.-Biol.
Interactions 51, 25-36 (1984)
42. LEVIJ, I.S.: Limited Reliability of the Morphological
Diagnosis of Drug Induced Liver Damage.
p. 109 in: M. Eliakim, J. Eshchar, H.J. Zimmerman
(Eds.) International Symposium on Hepatotoxicity,
Academic Press, New York (1974)
43. MASUDA, Y., YANO, Y., SUMIDA, S., MURANO, I.: Studies on
the Function of Cell Membrane. 10th report: Effect of
CCl₄ on the Marker Enzyme Activities and Fine Struc-
tures of Rat Liver Plasma Membranes and Microsomes In
vitro. Japan. J. Pharmacol. 25, 151-160 (1975)

44. MERCK Index p. 693:
Rahway, New York (1982)
45. MILLER, L.L., BLY, C.G., WATSON, M.L., BALE, W.F.: The
Dominant Role of the Liver in Plasma Protein Synthesis. *J. Exp. Med.* 94, 431-445 (1951)
46. MITCHELL, J.R., CORCORAN, G.B., HUGHES, H. et al.: Acute
Lethal Liver Injury Caused by Chemically Reactive
Metabolites.
p. 117 in: Brown, S.S., Davies, D.S. (Hrsg.): Organ
directed toxicology, chemical indices and mechanisms. IUPAC Series, Pergamon Press, Oxford (1981)
47. MÜLLER, L.: Differential Sensivity of Integrity Criteria
as Indicators of Cadmium-Induced Cell Damage.
Tox. Lett. 21, 21-27 (1984)
48. MYGIND, B., MUNCH-PETERSEN, A.: Transport of Pyrimidine
Nucleosides in Cells of Escherichia Coli K 12.
Eur. J. Biochem. 59, 365-72 (1975)
49. OHKAWA, H.: Assay for lipid peroxides in animal tissues
by Thiobarbituric Acid Reaction. *Anal. Biochem.* 95,
351-358 (1979)
50. OKASAKI, K.: Effects of Ethionine on ATP Levels and
Ionic Composition of Liver Cell Injury. *J. Biol.
Chem.* 243, 4661-4666 (1968)
51. PAUL, J.: Cell and Tissue Culture. Curchill-Livingstone,
Edinburgh (1975)

52. PLAA, G.L., WITSCHI, H.: Chemicals, Drugs and Lipid Peroxidation. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 16, 125-141 (1976)
53. PLAGEMANN, P.G.W.: Nucleotide Pools of Novikoff Rat Hepatoma Cells Growing in Suspension Culture. II. Independent Nucleoside Pools for Nucleic Acid Synthesis. J. Cell. Physiol. 77, 241-258 (1971)
54. PLAGEMANN, P.G.W.: Nucleotide Pools of Novikoff Rat Hepatoma Cells Growing Suspension Culture. IV. Transport Systems J. Cell. Physiol. 77, 274 (1971)
55. PLAGEMANN, P.G.W., RICHEY, D.P.: Transport of Nucleoside, Nucleic Acid Bases, Choline and Glucose by Animal Cells in Culture. Biochem. Biophys. Acta 344, 263-305 (1974)
56. POLI, G., GRAVELA, E.: Lipid Peroxidation in Isolated Hepatocytes.
p. 215-241 in: Mc Brian, D.H.C., Slater, T.F. (Eds.): Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer. Academic Press. New York (1982)
57. RECKNAGEL, R.O., GLENDE, E.A., WALLER, R.I., LOWREY, K.: Lipid Peroxidation: Biochemistry, Measurement and Significance in Liver Injury.
p. 231-241 in Plaa, G., Rewitt, W.R. (Eds.): Toxicology of the Liver. Raven Press, New York (1982)
58. SCARKOWSKA, L.; KLINKENBERG, U.: On the Role of Ubiquinon in Mitochondria and Chemical Measurements of its Redox Reactions. Biochem. Z. 338, 174-178 (1963)

59. SCHIMASSEK, H.: Der Einfluß der Leber auf den extrazellulären Redoxquotienten Laktat/Pyruvat. Biochem. Z. 336, 468-473 (1963)
60. SCHONER, W.: Zum aktiven Na⁺- und K⁺-Transport durch die Membran tierischer Zellen. Angew. Chemie 83, 947-955 (1971)
61. SEGLER, P.O.: Preparation of Rat Liver Cells. Exptl. Cell Res. 82, 391-398 (1973)
62. SHULL, N.H.: Hepatic Phosphorylase and ATP levels in Ethionine Treated Rats. PC. 237, 1734-35, No. 8 (1962)
63. SINGER, S.J., NICOLSON, G.L.: The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. Science 175, 720-731 (1972)
64. SINGH, I.J., TONNA, E.A.: An Autoradiographic Assessment of the Incorporation of ³H-Uridine into DNA and RHNA of Osteoblasts of Ageing Mice. Connective Tissue Res. 4, 73-78 (1976)
65. STIER, A.: Toxicological Studies of Liver Cells by Microspectrofluorometry. Arch. Toxicol. 44, 45-54 (1980)
66. UNGEMACH, F.R.: Untersuchungen über die Schädigung der Plasmamembran von Hepatozyten nach Lipidperoxidation. Habil.-Schr. med. vet., München (1983)
67. UNGEMACH, F.R.: persönliche Mitteilung (1986)
68. UNGEMACH, F.R.; HEGNER, D.: Uptake of Thymidine into Isolated Rat Hepatocytes. Evidence for Two Transport

- Systems. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 359, 845-856 (1978)
69. UNGEMACH, F.R.; HEGNER, D.: Thymidine Transport in Hepatocytes. An Assay for Hepatotoxicity. Arch. Toxicol. 44, 167-173 (1980)
70. UNGEMACH, F.R.; HEGNER, D.: Effect of Local Anesthetics on Cellular Respiration and Thymidine Transport in Hepatocytes from Young and Old Rats. Mech. Ageing and Develop. 14, 127-135 (1980)
71. VONEN, B.; MORLAND, J.: Isolated Rat Hepatocytes in Suspension: Potential Hepatotoxic Effects of Six Different Drugs. Arch. Toxicol. 56, 35-37 (1984)
72. YOUNES, M., ALBRECHT, M., SIEGERS, C.-P.: Interrelation Between Lipid Peroxidation and Lysosomal Enzyme Release in Presence of CCl₄, Cumene Hydroperoxides or Thioacetamide. Res. Comm. in Chem. Path. and Pharm. 40 (1), 121-132 (1983)
73. ZAR, J.H.: Biostatistical Analysis, p. 243. Prentice Hall International, London (1974)
- 73a ZAWIDWSKY, D: Spontaneous ⁵¹Cr Release by Isolated Rat Hepatocytes: An Indicator of Membrane Damage. In vitro 14 (8). (1978)
74. ZIMMERMAN, H.J.: Hepatic Metabolism of Foreign Compounds.
p. 15 in: Zimmerman, H.J. (Ed.): Hepatotoxicity. Appleton-Century-Crofts, New York (1978)

75. ZIMMERMAN, H.J.: Vulnerability of the Liver to Toxic Injury in: Zimmerman, H.J. (Ed.): Hepatotoxicity. Appleton-Century-Crofts, New York (1978)
76. ZIMMERMAN, H.J.: Classification of Hepatotoxins and Mechanisms of Hepatotoxicity.
p. 101 in: Zimmerman, H.J. (Ed.): Hepatotoxicity Appleton-Century-Crofts, New York (1978)
77. ZAWIDIWSKY, D.: Spontaneous ^{51}Cr Release by Isolated Rat Hepatocytes: An Indicator of Membrane Damage. In Vitro 14 (8), (1978)

22. L E B E N S L A U F

11. November 1959	in Karlsruhe geboren als Tochter des Diplom-Ingenieurs Rainer Stiehl und seiner Ehefrau Renate
1966-1969	Besuch der Grundschule in Karlsruhe
1969-1978	Besuch des Lessing-Gymnasiums in Karlsruhe
April 1978	Erlangung der allgemeinen Hochschul- reife
Oktober 1978 - September 1980	Studium der Veterinärmedizin an der Tierärztlichen Hochschule Hannover
November 1980 - November 1983	Fortführung des Studiums an der Tier- ärztlichen Fakultät der Universität München
Oktober 1982	Eheschließung mit Frank de Bruyne
3. November 1983	Abschluß des Studiums mit dem Tier- ärztlichen Staatsexamen
Dezember 1983	Approbation und Beginn der Doktorar- beit am Institut für Pharmakologie der Tierärztlichen Fakultät der Universi- tät München
seit 1985	Tätigkeit als Assistenztierärztin und Praxisvertretung

